

**Hormonelle Regulation der Cholesterinester-
hydrolase in der Nebennierenrinde:
In Vitro- und in Vivo-Untersuchungen**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

Diplom-Biologin

CORNELIA BALKOW

aus Mülheim-Ruhr

Bochum 1984



Digitized by the Internet Archive
in 2026

**Hormonelle Regulation der Cholesterinester-
hydrolase in der Nebennierenrinde:
In Vitro- und in Vivo-Untersuchungen**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Diplom-Biologin
CORNELIA BALKOW
aus Mülheim-Ruhr

Bochum 1984

Ein Teil der vorliegenden Arbeit wurde unter dem Titel:

"Activation of Hormone-Sensitive Cholesterol Esterase in Cultured Mouse Adrenal Tumor Cells. Possible Involvement of C-Kinase"

auf der Herbsttagung der Gesellschaft für Biologische Chemie, Gießen 1984, vorgestellt.

(C. Balkow, U.Sonnenborn and W.-H. Kunau:

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chemie 365, 963)

ABKÜRZUNGEN

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon, Corticotropin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATP- γ -S	Adenosin-5'-O-3-thiotriphosphat
BIS	N,N'-Methylenbisacrylamid
BSA	Rinderserumalbumin
CEH	Cholesterinester-Hydrolase
cAMP	cyclisches 3',5'-Adenosinmonophosphat
cGMP	cyclisches 3',5'-Guanosinmonophosphat
Ci	Curie
cpm	counts per minute
Da	Dalton
db cAMP	cyclisches dibuturyl 3',5'-Adenosinmonophosphat
DFP	Diisopropylfluorophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTE	1,4-Dithioerythrit
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EGTA	Äthylenglykol-bis-(2-Aminoäthyläther)- N,N'-tetraessigsäure
FKS	Fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/sec ²)
h	Stunde
HDL	High Density Lipoprotein
K-PO ₄ -(Puffer)	Kaliumphosphat(puffer), K ₂ HPO ₄ +KH ₂ PO ₄
LDL	Low Density Lipoprotein
MG	Molekulargewicht
min	Minute
MOPS	2(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
γ_3 -MSH	γ_3 -Melanocyten-stimulierendes Hormon
OD	Optische Dichte
PA	4,3-Phorbol-13-Monoacetat
PEG	Polyäthylenglykoll
PG	Prostaglandin
P _i	anorganisches Phosphat
pNPP	para-Nitrophenylphosphat

POPOP	1,4-bis-2-(4-Methyl-5-phenyloxazolyl)-Benzol
PPO	2,5-Diphenyloxazol
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
TFP	Trifluoperazin-Dihydrochlorid
TPA	4,3-Phorbol-12,3-Myristat-13 α -Acetat
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
Upm	Umdrehung pro Minute
100 $\bar{u}$	100 000xg Überstand
20 $\bar{u}$	20 000xg Überstand
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	11
2.1	Chemikalien und Radiochemikalien	11
2.2	Zellsuspension von Nebennierenzellen der Ratte	12
2.2.1	Herstellung der Zellsuspension	12
2.2.2	Inkubationsbedingungen	13
2.3	Züchtung von Y-1 Zellen	13
2.3.1	Züchtungsbedingungen	13
2.3.2	Zellvermehrung	14
2.3.3	Einfrieren der Zellen	15
2.4	Präparation vom 100 000xg Überstand	16
2.4.1	Herstellung eines 100 Ü aus der Rattennebenniere	16
2.4.2	Herstellung eines 100 Ü aus Y-1 Zellen	16
2.5	Herstellung von [γ - ³² P]ATP	17
2.6	Enzymbestimmungen	18
2.6.1	CEH-Bestimmung	18
2.6.1.1	Synthese von Cholesterin[³ H]oleat	18
2.6.1.2	Präparation des BSA-Substrats	19
2.6.1.3	Durchführung des CEH-Tests	19
2.6.2	p-Nitrophenylphosphat-Test	20
2.6.3	Proteinkinase C-Bestimmung	20
2.7	Steroid-Bestimmung	21
2.8	Präparation von LDL	21
2.9	Delipidieren von Seren	22
2.10	Markierungsversuche von Radioisotopen	23
2.10.1	[³ H]DFP-Markierung von Proteinen	23
2.10.2	Markierung des intrazellulären Cholesterin- esterpools mit [9,10(n)- ³ H]Oleat	23
2.10.2.1	Herstellung des [³ H]Oleat/Albumin-Komplexes	23
2.10.2.2	Inkubationsbedingungen während der Markierung	23
2.10.2.3	Bestimmung des intrazellulären Cholesterin- [³ H]oleats	24
2.11	Säulenchromatographie	24
2.11.1	Gelchromatographie an Sephadex G25	25
2.11.2	Gelchromatographie an Sepharose CL-6B	25

	Seite
2.11.3	Gelchromatographie an Sephacryl S-300 25
2.11.4	Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose 25
2.11.5	Kationenaustauschchromatographie an Phosphocellulose P-11 26
2.12	Entsalzung durch Mikrozentrifugation 26
2.13	Proteinbestimmungsmethoden 26
2.13.1	Proteinbestimmung nach Bradford 26
2.13.2	Modifizierte Proteinbestimmung nach Lowry 27
2.14	Slabgel-Polyacrylamid-Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli 27
2.15	Autoradiographie und Fluorographie von Slab-Gelen 29
2.16	Leitfähigkeitsmessung 30
2.17	pH-Messungen 30
3.	ERGEBNISSE - TEIL A - 31
	Untersuchungen an der Nebenniere der Ratte 31
3.1	Steroidogenese in suspendierten Nebennierenzellen 31
3.1.1	Excitations- und Emissionsspektrum von Corticosteron 31
3.1.2	Dosis-Wirkungs-Kurve von ACTH und db cAMP 32
3.1.3	Ca ²⁺ -Abhängigkeit der ACTH- und db cAMP-induzierten Steroidogenese 33
3.1.4	Effekt der Dexamethasongabe auf die Steroidogenese 34
3.1.5	Inhibierung der ACTH-induzierten Steroidogenese durch TFP 40
3.2	In vitro-Untersuchungen zur Regulation der CEH im 100 Ü 41
3.2.1	Bestimmung der CEH-Aktivität mit dem radioaktiven BSA-Test 41
3.2.1.1	Substratabhängigkeit 42
3.2.1.2	Zeitabhängigkeit 43
3.2.1.3	Proteinabhängigkeit 44
3.2.2	Gelfiltration eines 100 Ü an Sephacryl S-300 45

3.2.3	Versuche zur Aktivierung der CEH	48
3.2.3.1	Abhängigkeit der Aktivierung von der BSA-Substrat-Form	48
3.2.3.2	Abhängigkeit von den Cofaktorkonzentrationen (Mg^{2+} , ATP, ATP- γ -S, cAMP)	50
3.2.3.3	Abhängigkeit der Aktivierung von der Proteinkonzentration	54
3.2.3.4	Kinetik der Aktivierung mit ATP und ATP- γ -S	57
3.2.3.5	Einfluß von Phosphataseinhibitoren auf die Aktivierung	60
3.2.3.6	Einfluß von Proteinkinase-Inhibitor auf die Aktivierung	62
3.2.3.7	Rekombinationsversuche zur Aktivierung nach Abtrennung der katalytischen Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase	64
3.2.4	Gelchromatographie eines 100 Ü an Sepharose CL-6B	67
3.2.5	Inhibierung der CEH-Aktivität durch TFP	71
3.2.6	Präparative Herstellung einer stabilen aktivierten CEH-Form	72
3.2.7	In vitro-Phosphorylierung der CEH	76
3.2.7.1	Phosphorylierungskinetik	79
3.2.7.2	Dephosphorylierungskinetik - Einfluß von Phosphataseinhibitoren	83
3.2.7.3	Phosphorylierung des P-11-Durchlaufs	87
4,	ERGEBNISSE - TEIL B -	89
	Untersuchungen an Y-1 Zellen	89
4.1	Steroidogenese in Y-1 Zellen	89
4.1.1	Dosis-Wirkungs-Kurve von ACTH und db cAMP	89
4.1.2	Kinetik der ACTH-induzierten Steroidogenese bei "Normal"- und "LDL-vorinkubierten" Zellen	91
4.1.3	Inhibierung der ACTH-induzierten Steroidogenese durch TFP	95

	<u>Seite</u>
4.1.4	Stimulierung der Steroidogenese durch Cyclo- und Lipoxygenase-Inhibitoren 96
4.1.5	Einfluß von γ_3 -MSH auf die ACTH-induzierte Steroidogenese 99
4.1.6	Einfluß verschiedener Substanzen auf den Abbau endogener Cholesterinester und auf die dazugehörige Steroidogenese 100
4.2	In vitro-Untersuchungen zur Regulation der CEH im 20 Ü 108
4.2.1	Verteilung der CEH-Aktivität bei der Präparation des 20 Ü 108
4.2.2	Protein- und Zeitabhängigkeit der CEH-Aktivität 110
4.2.3	Inhibierung der CEH-Aktivität durch TFP 111
4.2.4	Gelfiltration eines 20 Ü an Sepharose CL-6B 112
4.2.5	Versuche zur Aktivierung der CEH 114
4.2.5.1	Kinetik der Aktivierung mit ATP und ATP- γ -S 114
4.2.5.2	Einfluß von Phosphataseinhibitoren auf die Aktivierung 117
4.2.5.3	Rekombinationsversuche zur Aktivierung nach Abtrennung der katalytischen Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase 119
4.2.6	In vitro-Phosphorylierung der CEH 121
4.2.6.1	Phosphorylierungskinetik 121
4.2.6.2	Dephosphorylierungskinetik 124
4.3	In vivo-Stimulierung der CEH durch ACTH, db cAMP, γ_3 -MSH und TPA 128
4.4	Bestimmung der Proteinkinase C-Aktivität in γ_3 -MSH behandelten Zellen 130
5.	DISKUSSION 132
5.1	In vitro-Charakterisierung der CEH 132
5.2	Vergleich der beiden Zellsysteme: Suspendierte Zellen der Nebenniere der Ratte und Y-1 Zellen 136
5.3	Regulation der CEH: Biologische Stimuli und Mediatoren der Informationsübertragung 139
6.	ZUSAMMENFASSUNG 149
7.	LITERATURVERZEICHNIS 151

1. EINLEITUNG

Steroidogenese

Die Nebenniere ist ein wichtiges endokrines Organ des höheren tierischen Organismus. Sie besteht aus zwei Gewebetypen, die sich ursprungsmäßig und funktionell unterscheiden [1]: das Nebennierenmark, Produzent von Adrenalin und Noradrenalin, und die Nebennierenrinde, die neben den Gonaden und der Plazenta Steroidhormone synthetisiert [1,2]. Der histologische Aufbau der Nebennierenrinde zeigt drei klassische Zonen. Die äußere, an der Bindegewebskapsel anliegende Zona glomerulosa (Ballmuster), die zentrale Zona fasciculata (Säulenmuster) und die an das Mark grenzende Zona reticularis (Netzwerkmuster) [2,3]. Während in der Zona glomerulosa relativ wenige Lipidtropfen vorhanden sind, zeichnet sich insbesondere die Zona fasciculata und z.T. auch die Zona reticularis durch einen sehr hohen Lipidgehalt aus [2,4].

Nur die Zellen der Zona glomerulosa sind zur Bildung des Mineralocorticoids Aldosteron befähigt [3,5], die Glucocorticoide, z.B. Cortisol und Corticosteron, werden dagegen hauptsächlich in der Zona fasciculata-reticularis produziert [5]. Die Aldosteron Sekretion steht primär unter der Kontrolle des Renin-Angiotensin Systems [6-8], wohingegen die Synthese der anderen Steroidhormone durch Corticotropin (ACTH) reguliert wird [9-16].

Neben dem ACTH wird in letzter Zeit aber auch von mehreren Arbeitsgruppen das Mitwirken von γ -MSH an der Steroidogenese diskutiert [17-21]. Beide Hypophysenhormone, γ -MSH und ACTH, entstehen aus der gleichen Vorstufe, dem Pro-Opimelanocortin [22,23].

Das native ACTH-Molekül besteht aus 39 Aminosäuren [24,25], von denen die ersten 24 für die biologische Aktivität verantwortlich sind [25,26]. Wie Kopplungsstudien zeigten, behält das ACTH-Molekül auch nach Anlagerung an große, inerte Polymere die Fähigkeit, die Steroidogenese zu stimulieren [27-30]. Dies weist darauf hin, daß das Hormon an spezifische Rezep-

toren an der Zellmembranoberfläche von Nebennierenzellen bindet [31,32].

Haynes [33] konnte als erster zeigen, daß nach ACTH-Stimulierung die intrazelluläre cAMP-Konzentration in der Rindernebenniere ansteigt und stimulierte die Steroidogenese durch exogen zugesetztes cAMP [34]. ACTH bewirkt eine Aktivitätssteigerung der Adenylatcyclase, wodurch ein erhöhter intrazellulärer cAMP-Spiegel resultiert, so daß Sutherland dieses cyclische Nukleotid als "second messenger" der ACTH-Wirkung postulierte [14]. Die Aktivierung der Adenylatcyclase durch ACTH ist Ca^{2+} -abhängig [35], wobei in neueren Untersuchungen festgestellt wurde, daß Ca^{2+} die Interaktion des Enzyms mit Guanin Nukleotiden erhöht [36] und so eine Aktivitätssteigerung verursacht wird.

cAMP führt in der Zelle zur Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase [37,38]. Besonders vorteilhaft erwiesen sich bei diesen Untersuchungen Mutanten von Tumorzellen der Nebenniere der Maus (Y-1 Zellen) [39-44]. So konnte z.B. gezeigt werden, daß bei diesen Zellen nur Typ I der cAMP-abhängigen Proteinkinase an der ACTH-stimulierten Steroidogenese beteiligt ist [44,45].

Bei Stimulierungsexperimenten mit submaximalen ACTH-Konzentrationen ergaben sich immer wieder Diskrepanzen zwischen Steroidogeneserate und gemessenem cAMP-Spiegel [46,47], so daß Sharma und Mitarbeiter bei niedrigen Hormonkonzentrationen cGMP als "second messenger" vermuteten, während cAMP der Mediator bei hohen Konzentrationen sein sollte [11,48,49]. Versuche an isolierten Zellen von Rattennebennieren mit dem o-Nitrophenylsulfenyl-Derivat des ACTH's (NPS-ACTH) [50] führten zu einer erhöhten Steroidogenese, doch konnte auch in diesem Fall kaum ein Anstieg in der intrazellulären cAMP-Konzentration bestimmt werden [50]. Die Autoren versuchten diesen Befund mit zwei unterschiedlichen ACTH-Rezeptorpopulationen zu erklären, die über verschiedene Mechanismen die Steroidogenese induzieren sollten [50]. Die Arbeitsgruppe von Schulster sah cAMP ebenfalls nicht als obligaten "second messenger" an und bewies durch Bindungsstudien die Existenz von zwei unterschiedlichen

Rezeptortypen für ACTH, die die Zellantwort durch verschiedene Mediatoren bewirken sollten [51,52].

Erklärbar wäre der nicht meßbare Anstieg in der cAMP-Konzentration aber auch mit einer Kompartimentierung des Nukleotids, so daß schon eine minimale Änderung der cAMP-Konzentration in bestimmten und begrenzten Gebieten der Zelle eine erhöhte Steroidogenese verursacht [53,54].

Auf der Suche nach anderen Mediatoren schrieb Neher Ca^{2+} die Rolle als direkten "second messenger" zu [55,56], aber auch das Mitwirken von Prostaglandinen an der Steroidogenese wird von vielen Arbeitsgruppen diskutiert. Zum einen konnte gezeigt werden, daß ACTH und NPS-ACTH bei isolierten Zellen aus der Katzennebenniere eine vermehrte Ausschüttung der Prostaglandine E und $\text{F}_{2\alpha}$ verursachen [57-59], zum anderen wurde die Steroidogenese in Nebennierenzellen vom Rind und der Katze durch Prostaglandine selbst initiiert [60,61]. An der Steroidogenese in der Rattennebenniere sollen diese Mediatoren nach Matsuoka et al. aber keine relevante Bedeutung haben [62].

Auch eine Beteiligung der Phospholipase A bei der ACTH-Stimulierung wurde vielfach diskutiert [63,64]. In jüngster Zeit ist das Mitwirken von Phospholipiden besonders von der Arbeitsgruppe von Farese genauer untersucht worden [65-68], und es gilt als bestätigt, daß nach kurzzeitiger ACTH-Einwirkung der Di- und Triphosphoinositol-Spiegel in den Nebennierenzellen um ein Vielfaches ansteigt [69], so daß man heute den Polyphosphoinosiden eine bedeutende Rolle in der hormonellen Regulation einräumt.

An welchen Reaktionen der Biosynthesesequenz von Steroidhormonen die diskutierten Mediatoren jedoch beteiligt sind, ist weitgehendst unbekannt.

Ausgangsprodukt für die Biosynthese aller Steroidhormone ist das Cholesterin, das die Zelle entweder de novo aus Acetat synthetisiert [69], aus Lipoproteinen aufnimmt [70] oder aus gespeicherten, intrazellulären Cholesterinestern freisetzt [71]. Dieses durch die Hormon-sensitive Cholesterinester-Hydrolase freigesetzte Cholesterin wird wahrscheinlich mittels

eines Transportproteins ("sterol carrier protein") [72] in die Mitochondrien transportiert und dort durch die Desmolase ("side-chain-cleavage"-Enzym) zu Pregnenolon umgewandelt [73]. Diese Reaktion ist durch ACTH stimulierbar [74] und stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Steroidbiosynthese dar [75]. Kowluru et al. beobachteten an gereinigtem Cytochrom P₄₅₀ aus der Rindernebenniere, einem Coenzym der mischfunktionellen Oxygenase des Desmolase-Komplexes, einen stimulierenden Effekt von Phospholipiden [76], so daß die Phosphoinositide direkten Einfluß auf die "side-chain-cleavage"-Reaktion haben könnten. Cycloheximid gilt als Inhibitor der ACTH-induzierten Steroidogenese [77], wobei der molekulare Mechanismus dieses Effektes noch nicht bekannt ist. Pedersen und Brownie [78] fanden ein Cycloheximid-sensitives cytosolisches Aktivatorpeptid des "side-chain-cleavage"-Enzyms, das das postulierte "labile" Enzym in der ACTH-abhängigen Steroidogenese sein könnte.

Die weitere Umwandlung von Pregnenolon zu 11-Desoxycortisol und 11-Desoxycorticosteron findet an den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums statt [73]. Nach der letzten Hydroxylierung am C-11, eine Reaktion, die wiederum von einem mitochondrialen Enzym katalysiert wird [73], werden die Hormone sofort aus der Zelle geschleust [1] und nicht wie viele andere Hormone intrazellulär gespeichert. Über den Mechanismus der Sekretion ist wenig bekannt, eventuell findet eine nach Rubin et al. postulierte Ca²⁺-abhängige Exozytose statt [79,80].

Cholesterinester-Hydrolase (CEH)

Die Bereitstellung des Cholesterins für die Steroidogenese erfolgt durch Hydrolyse der in den Lipidtropfen gespeicherten Cholesterinester [81,82]. Diese, durch humoralen Reiz stimulierte Reaktion, wird von der Hormon-sensitiven Cholesterinester-Hydrolase an der Oberfläche der Lipidtropfen (Phasengrenze) katalysiert [83].

In vivo-Untersuchungen am Ganztier zeigten, daß sowohl ACTH [84] als auch Streß [85] nicht nur eine erhöhte Steroidogenese

verursachen, sondern auch eine Verminderung der intrazellulären Cholesterinester [71,77,82] und eine erhöhte CEH-Aktivität [71,82,86-88] bewirken.

An isolierten Nebennierenzellen der Ratte konnte ebenfalls nach ACTH-Zugabe eine Verminderung des Cholesterinestergehaltes [89] beobachtet werden; auf die Untersuchung der CEH-Aktivität verzichteten die Autoren aber, so daß letztlich der direkte Beweis für eine Aktivierung des Enzyms nach ACTH-Stimulus in einem Zellsystem fehlt.

Es wurde aber weiterhin gezeigt, daß nicht nur ACTH, sondern auch exogen zugesetztes db cAMP und PGE_2 den Cholesterinesterabbau in suspendierten Nebennierenzellen der Ratte beschleunigen [90]; da alle diese Substanzen eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels verursachen, wird eine cAMP-abhängige Phosphorylierung der CEH postuliert [91-96].

Durch in vitro-Untersuchungen konnte nach Zugabe von Mg^{2+} , ATP und cAMP nicht nur eine erhöhte Enzymaktivität [91-96], sondern auch ein vermehrter [^{32}P]Phosphateinbau [93-96] in angereicherte Esterasefraktionen nachgewiesen werden. Zugabe von Inhibitor der cAMP-abhängigen Proteinkinase verhinderte dagegen eine Aktivierung des Enzyms [95], so daß letztlich das von Beckett und Boyd [95] vorgeschlagene Modell der cAMP-abhängigen Phosphorylierung der CEH bei der in vitro-Aktivierung als nahezu bewiesen gilt. Gezielte Versuche zu der mit dem Regulationsmechanismus verbundenen Dephosphorylierung des Enzyms sind nicht bekannt. Khoo et al. [97] beobachteten in vitro eine Stimulierung der CEH-Aktivität auch nach Zugabe von cGMP und cGMP-abhängiger Proteinkinase zum 100 000xg Überstand aus der Nebenniere der Ratte.

Die funktionell gut untersuchte CEH ist molekular nur schlecht charakterisiert. Nicht nur die geringe Menge des Enzyms in der Nebenniere [98], sondern auch die methodischen Schwierigkeiten bei der Reinigung und Analytik dieses sehr hydrophoben Proteins führten dazu, daß es lange Zeit Diskrepanzen sowohl über das native Molekulargewicht (350 000 [96] oder 173 000 [95]) als auch über die Größe der Untereinheiten (41 000 [95], 84 000 [99], 92 000 [100]) gab. Erst durch [^3H]DFP-Markierung

konnte der CEH die 84 000 Da - [99,101] bzw. 87 000 Da - Unter-einheit [98] zugeordnet werden. Eine Reinigung bis zur Homogenität wurde bis zum heutigen Tag noch von keiner Arbeitsgruppe erzielt. Das partiell gereinigte Enzym aus der Nebenniere des Rindes (60fache Anreicherung) [99], das nach dem heutigen Wissensstand mit der Hormon-sensitiven Lipase des Fettgewebes identisch zu sein scheint [101], kann ebenfalls durch Zugabe von cAMP-abhängiger Proteinkinase aktiviert und phosphoryliert werden [101].

Im Vergleich zu anderen Nährstoffspeichern, wie dem Glykogen in Leber und Muskel [102] und den Triglyceriden im Fettgewebe [103], deren Abbau ebenfalls durch humoralen Reiz mittels Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen reguliert wird (Abb. 1), fehlt für die Cholesterinester-Hydrolase aus der Nebenniere letztlich immer noch der Beweis einer in vivo-Phosphorylierung des Enzyms nach Hormonstimulus, auch ist völlig ungeklärt, ob eine "multisite phosphorylation", an der mehrere Kinasen synergistisch beteiligt sind, vorliegt.

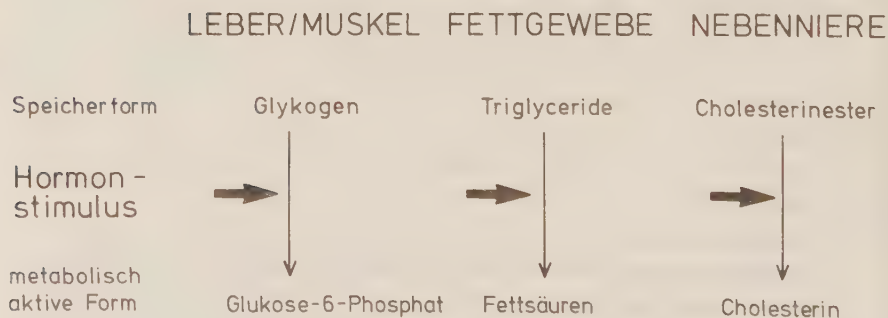


Abb. 1: Hormoneller Abbau verschiedener Nährstoffspeicher

Immer wieder gab es auch Widersprüchlichkeiten bezüglich gemessener CEH-Aktivität und Steroidogeneserate; so wurde zwar ein erhöhter Esterabbau durch PGE_2 in der Nebenniere der Ratte beobachtet [90], doch konnte keine erhöhte Steroidogenese nachgewiesen werden [62,90], was auf eine unabhängige Kontrolle zwischen CEH und Steroidogenese hinweist.

Interessant sind in diesem Zusammenhang auch die Studien von Pedersen und Brownie an hypophysektomierten Ratten [19,21,104], in denen die Autoren keinen Einfluß von ACTH auf die CEH beobachteten. Nach ihren Ergebnissen stimuliert nicht ACTH, sondern γ_3 -MSH die CEH [19,21], obwohl dieses Hormon keine erhöhte Steroidsekretion verursacht [18].

Farese et al. [18] konnte an isolierten Nebennierenzellen der Ratte zeigen, daß γ_3 -MSH keine Veränderung am intrazellulären cAMP-Spiegel bewirkt und daß dieses Hormon bei submaximalen ACTH-Konzentrationen eine Potenzierung der ACTH-induzierten Steroidogenese verursachen kann.

Zusammenfassend läßt sich der Kenntnisstand über die Regulation der CEH wie in Abb. 2 darstellen.

Die Aktivitätsmessungen an der CEH, sowohl nach ACTH- als auch nach γ_3 -MSH-Stimulus, basieren auf Experimenten am kompletten Ganztiersystem. Aktivierungsversuche unter definierten Bedingungen an einem Zellsystem sind bisher noch nicht durchgeführt worden, so daß letztendlich der direkte Beweis einer CEH-Stimulierung nach ACTH- und/oder γ_3 -MSH-Einwirkung auf Nebennierenzellen fehlt. Auch ist vollkommen unbekannt, welche anderen "second messenger", neben cAMP, an der Informationsübertragung beteiligt sind.

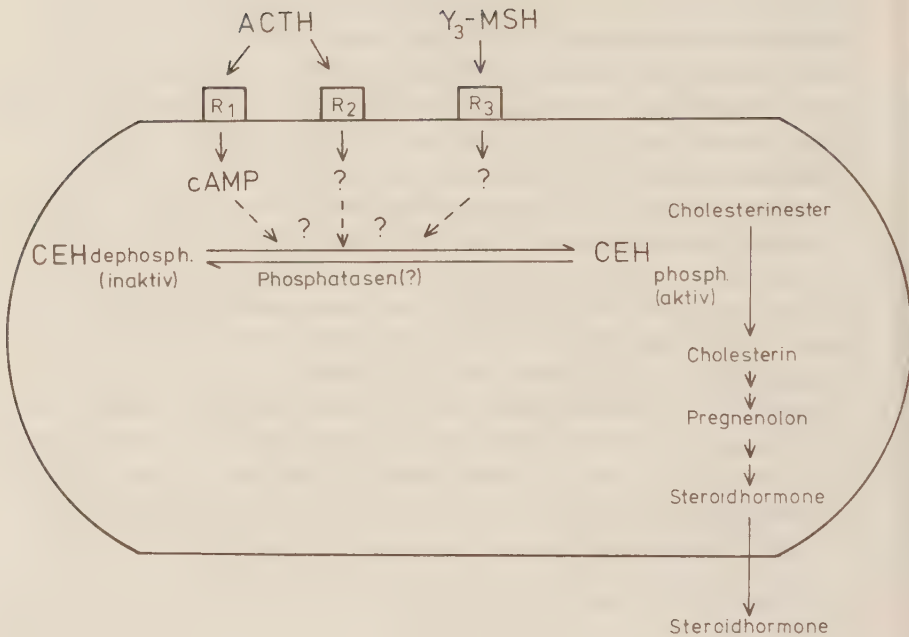


Abb. 2: Kenntnisstand über die in vivo-Regulation der CEH

Problemstellung

Da einerseits aus in vitro-Untersuchungen an der CEH nur relativ wenige und für die physiologische Bedeutung letztlich nicht beweiskräftige Ergebnisse vorlagen und andererseits durch die Komplexität des Ganztiersystems keine genauen Aussagen über die Regulation der CEH gewonnen werden konnten, war es das Hauptziel dieser Arbeit, ein Zellsystem zu finden, an dem diese Untersuchungen möglich waren. Ein solches System sollte nicht nur einfach zu etablieren sein, sondern mußte auch hinsichtlich der CEH mindestens drei Kriterien erfüllen: die CEH-Aktivität mußte gut meßbar sein, das Enzym sollte sich in vitro

aktivieren lassen und mußte als Polypeptid auf der SDS-PAGE identifizierbar sein.

Isolierte Nebennierenzellen der Ratte stellten in vielen Studien ein gutes Modell zur Untersuchung der Steroidogenese dar, außerdem war die CEH in dieser Spezies im Vergleich zum Rindersystem nur von wenigen Arbeitsgruppen in vitro untersucht worden, so daß die Nebennierenzellen der Ratte als ein erstes Untersuchungsobjekt ausgewählt wurden. Monolayerkulturen von Y-1 Zellen (Abb. 3), in denen weder CEH-Aktivität nachgewiesen war, noch die Hormonabhängigkeit des Enzyms untersucht worden war, stellten das zweite zu untersuchende Zellsystem dar.

Aus der dargestellten Problematik ergaben sich für die Durchführung dieser Arbeit zwei Aspekte.

- In vitro-Charakterisierung der CEH in Nebennierenzellen der Ratte und Y-1 Zellen, d.h. Bestimmung der Aktivität und Aktivierbarkeit sowie die molekulare Identifizierung des Enzyms.
- In vivo-Untersuchungen zur Stimulierung der CEH in diesen Zellsystemen; insbesondere wurde die Fragestellung nach den biologischen Stimuli, den Mediatoren der Informationsübertragung und nach dem molekularen Mechanismus der CEH-Aktivierung untersucht.

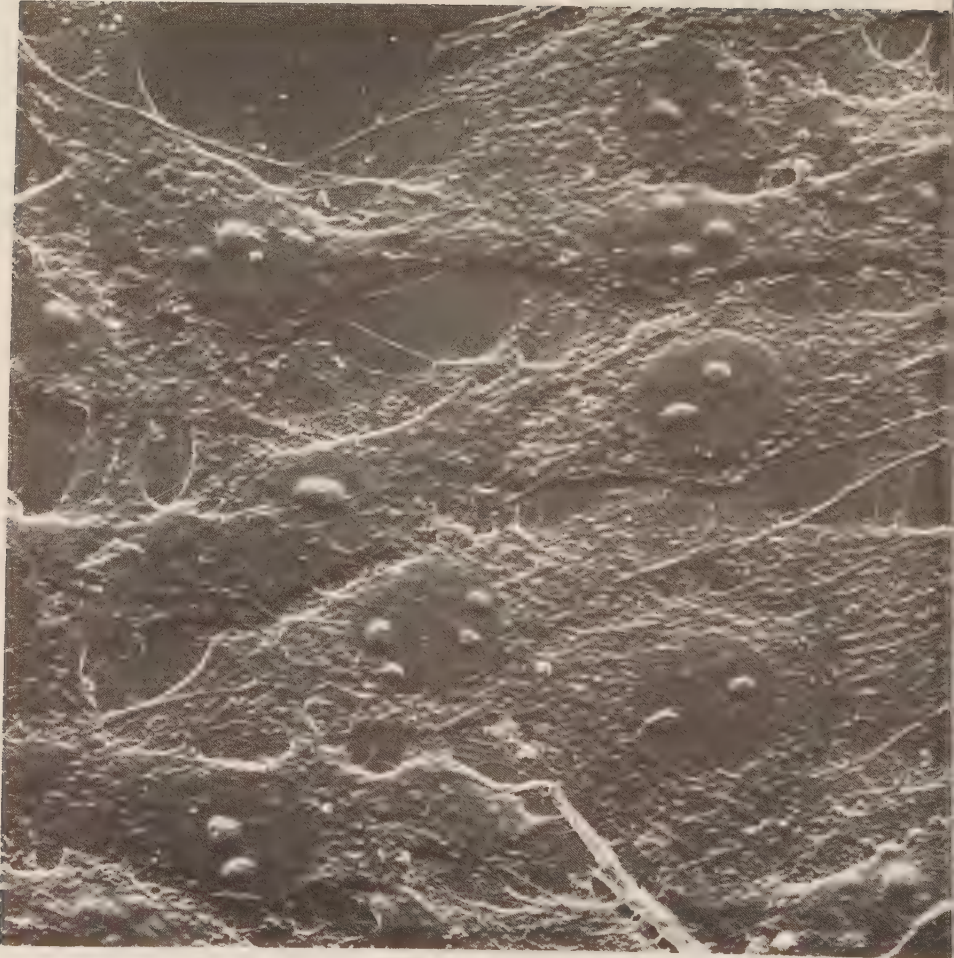


Abb. 3: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Y-1
Monolayer Kultur

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien und Radiochemikalien

Sephadex G25, Sephadex G50, Sephacryl S-300 und Sepharose Cl-6B waren von der Deutschen Pharmacia, Freiburg (BRD).

Phosphocellulose P-11 und DEAE-Cellulose (DE-52) wurden von Whatman, Maidstone, Kent (England) bezogen.

Die Firma Sigma, München (BRD), lieferte Rinderserumalbumin, Kollagenase (C-2139), Penicillin G, Histon H-1, Cortisol, Corticosteron, Cycloheximid, Diolein, Proteinkinase-Inhibitor (Walsh-Inhibitor), 4,3-Phorbol-12,3-myristat-13 α -acetat (TPA) und 4,3-Phorbol-13-monoacetat (PA).

Dexamethason, SDS, db cAMP, cGMP, Acrylamid, Bisacrylamid, Serva Blau G-250 und Serva Blau R-250 wurden bei der Firma Serva, Heidelberg (BRD), gekauft.

Die Biochrom KG, Heidelberg (BRD), lieferte Ham's F 10, Pferdeserum und Fötales Kälberserum.

Trypsin wurde von Difco Laboratories (USA) bezogen, und Cabosil stammte von Packard Instrument Co (USA). Synthetisches ACTH₁₋₂₄ war ein Geschenk von Ciba Geigy, Basel (Schweiz).

Trifluoperazin wurde von Smith Kline and French Laboratories Ltd (England) zur Verfügung gestellt.

PGE₂ war eine Gabe von der Upjohn Company, und Prof. Ling stellte das nach seiner Methode [105] präparierte γ_3 -MSH zur Verfügung.

Das aus Rinderhirn gereinigte Phosphatidylserin [107-108] stammte von Herrn Rolf Thieringer.

[³H]DFP (5 mCi), [9,10(n)-³H]ölsäure (5 mCi) und Adenosin-5'-(γ -[³⁵S]thio)triphosphat (8 mCi) wurden von Amersham International Ltd, Amersham (England), bezogen.

[³²P]Phosphat (10 mCi) und Autoradiographie Enhancer stammten von der Firma New England Nuclear, Boston (USA).

X-Omat AR Röntgenfilme (12.8 cm x 17.7 cm), Röntgenentwickler LX-24 und Röntgenfixierer AL 4 wurden bei der Firma Kodak gekauft.

Alle anderen verwendeten Chemikalien waren von p.A.-Qualität und stammten von den üblichen, in der BRD vertretenen Herstellerfirmen.

2.2 Zellsuspension von Nebennierenzellen der Ratte

2.2.1 Herstellung der Zellsuspension

Nach Herausnahme der Nebennieren aus der toten Ratte wurden diese sofort in eiskalten KRBAG-Puffer (s.u.) gelegt und dann möglichst schnell durch Anschneiden der Nebenniere mit einer Rasierklinge decapsuliert, indem der von Kapsel und Zona glomerulosa befreite Teil der Nebenniere aus der Kapselhülle herausgequetscht wurde.

In Anlehnung an die Methode von Trzeciak und Mathé [109] wurden die Nebennieren geviertelt und 3 x 20 min in KRBAG-Puffer (s.u.) mit 0,024% Kollagenase und 0,02% DNase bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert (je 0,4 ml pro Nebenniere). Das Inkubationsgefäß war aus Plastik oder silikonisiertem Glas und wurde fest verschlossen. Jede 10 min erfolgte eine 10sekündige Begasung mit 5% CO₂:95% O₂. Nach der jeweils 20minütigen Inkubation wurde der Puffer mit den herausgelösten Zellen mit einer Pasteurpipette abgenommen und 3 min bei 120xg zentrifugiert. Nach Zugabe von neuem Puffer zu den Nebennierenvierteln wurden diese 3 x mit einer Spritze ohne Kanüle hochgezogen und wieder herausgepreßt. Im Anschluß an die letzte Inkubation wurde die Suspension nochmals 3 x mit einer Spritze, dieses Mal jedoch mit Kanüle, hochgezogen und herausgepreßt, um möglichst das gesamte Gewebe aufzulösen. Vor der Zentrifugation wurde die Suspension zur Abtrennung von Geweberesten durch Nylongaze filtriert.

Die 3 erhaltenen Zellpellets wurden vereinigt, die Zellen mindestens 3 x mit KRBAG-Puffer (s.u.) gewaschen und schließlich im gleichen Puffer suspendiert ($100-200 \times 10^3$ Zellen/ml). Die Zellausbeute pro Nebenniere betrug zwischen 80 und 150×10^3 Zellen.

KRB = Krebs-Ringer-Bikarbonat-Lösung

	<u>mM</u>	<u>g/l</u>
NaCl	120	7,01
KCl	4,7	0,35
NaHCO ₃	2,5	2,10
KH ₂ PO ₄	1,2	0,16
MgSO ₄ x 7H ₂ O	1,2	0,30
CaCl ₂ x 2H ₂ O	2,5	0,37

KRBAG: KRB mit 1% BSA und 0,2% Glukose

Die KRB-Lösung wurde vor Gebrauch 10 min mit 5% CO₂:95% O₂ begast, damit sich ein pH-Wert von 7,4 einstellte.

2.2.2 Inkubationsbedingungen

Ein Inkubationsansatz enthielt zwischen 100 und 200 x 10³ Zellen in 1 ml KRBAG-Puffer mit den im Text vermerkten Zusätzen. Als Inkubationsgefäße wurden verschließbare Plastikröhrchen verwendet, in denen die Suspension jede 10 min kurzzeitig (10 sec) mit 5% CO₂:95% O₂ begast wurde. Nach 30 min Inkubation bei 37°C in einem Schüttelwasserbad wurde der Ansatz durch Zugabe von 5 ml Dichlormethan abgestoppt und der Corticosterongehalt bestimmt (siehe 2.7).

2.3 Züchtung von Y-1 Zellen

2.3.1 Züchtungsbedingungen

Y-1 Zellen wuchsen routinemäßig in Monolayerkulturen in Ham's F10 Medium supplementiert durch 15% Pferdeserum und 2,5% FKS [110,111]. Alle mit der Kultur ausgeführten Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen in einer Laminar Flow. Die verwendeten Gefäße wurden entweder steril gekauft oder vor Gebrauch autoklaviert. Das pulverisierte Ham's F10 Medium wurde wie vom Hersteller angegeben in H₂O bidest gelöst und mit-

tels einer Sartorius Membranfilteranlage sterilfiltriert. Alle anderen Lösungen wurden z.T. steril erworben oder durch einen an einer Spritze befestigten Membranfilter (0.4 μm /Sartorius) sterilfiltriert. Die Zellzucht erfolgte in 250 ml Gewebekulturflaschen (75 cm^2 /Greiner) in einem 37°C Brutschrank mit einer 5%igen CO_2 -Atmosphäre.

Alle 2 bis 3 Tage wurde das Kulturmedium erneuert.

2.3.2 Zellvermehrung

Nach ca. 6 bis 8 Tagen Wachstum in der Gewebekulturflasche war der Monolayer so dicht ($2,7 \times 10^5$ Zellen/ cm^2), daß die Zellen auf mehrere Kulturflaschen umgesetzt werden mußten. Nach Absaugen des Mediums mit einer an einer Wasserstrahlpumpe befestigten Pasteurpipette wurden 2 ml auf 37°C vorgewärmte Trypsin-Versen-Lösung (s.u.) zu den Zellen pipettiert; nach 30 sec Einwirkungszeit wurde die Lösung wieder abgesaugt und erneut 2 ml Trypsin-Versen-Lösung zu den Zellen gegeben. Unter Schütteln der Kulturflasche lösten sich die Zellen nach einigen min Inkubation vom Boden der Flasche ab. Die Zellsuspension wurde mit einer Pasteurpipette entnommen und in 10 ml Ham's F10 mit Seren überführt. Nach 10 min Zentrifugation bei 500xg wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in wenigen ml Medium unter Zuhilfenahme einer 10 ml Shorty-Pipette (Belco) suspendiert.

Diese Zellsuspension wurde dann zu 80 ml Medium pipettiert und auf 4 neue Gewebekulturflaschen (je 20 ml) verteilt. Für einige Versuche wurden die Zellen bei der letzten Passage entweder auf 14 cm $\varnothing$ oder 2 cm $\varnothing$ Petrischalen (Nunc) umgesetzt.

Trypsin-Versen-Lösung

A Trypsin-Lösung

	g
NaCl	8,0
KCl	0,4
$\text{NaHPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,12
Glukose	1,0
Tris	3,0

A	<u>g</u>
Penicillin	0,063
Streptomycin	0,1
Trypsin	2,5
1% Phenolrot	1,5 ml

in 800 ml H₂O bidest lösen, mit 1 N HCl auf pH 7.7 einstellen und auf 1 l mit H₂O bidest auffüllen.

B Versen-Lösung	<u>g</u>
NaCl	8,0
KCl	0,2
Na ₂ HPO ₂ x 2 H ₂ O	1,44
KH ₂ PO ₄ x 3 H ₂ O	0,26
Versen (Triplex III)	0,2
1% Phenolrot	1,5 ml

auf 1 l mit H₂O bidest auffüllen

Trypsin-Versen-Lösung: 1 Teil A + 4 Teile B

2.3.3 Einfrieren der Zellen

Nach Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturflasche (siehe 2.3.2) wurde das Zellpellet nach der Zentrifugation in Ham's F10 Medium mit 30% Pferdeserum und 10% DMSO suspendiert (1 ml pro 10⁷ Zellen). Diese Zellsuspension wurde in 1 ml Portionen in Einfriereröhrchen (Greiner) transferiert und in einem Stickstoff-Behälter (Union Carbide) bei -196°C eingefroren.

Die so gelagerten Zellen waren jahrelang haltbar und konnten nach Bedarf aufgetaut und in frischem Medium weiter vermehrt werden.

2.4 Präparation vom 100 000xg Überstand

2.4.1 Herstellung eines 100 Ü aus der Rattennebenniere

Die aus der Ratte herauspräparierten Nebennieren wurden wie in 2.2.1 decapsuliert und nach Zugabe von eiskaltem Homogenisationspuffer (s.u.) (10 Nebennieren/ml) 10 x im motorgetriebenen Elvehjem-Potter bei 800 U.p.m. homogenisiert. Das Homogenat wurde dann 1h bei 100 000xg in einer Hitachi 65P-Zentrifuge (Rotor RP 65T) zentrifugiert. Der 100 Ü wurde mittels einer Spritze mit einer langen Kanüle entnommen, so daß sich die anfangs flotierende Fettphase schließlich am Boden des Zentrifugenröhrchens absetzte und der Überstand fettfrei war.

Der 100 Ü wurde in Portionen von 1 ml bei -20°C eingefroren und war so monatelang ohne Aktivitätsverlust haltbar.

Homogenisationspuffer:

50 mM Tris-HCl pH 7,4, 2 mM DTE, 0,5 mM Benzamidin, 250 mM Saccharose.

2.4.2 Herstellung eines 100 Ü aus Y-1 Zellen

Monolayer von 6 Petrischalen (14 cm Ø) wurden mit einem Rubber Policeman unter Zugabe von ein paar ml Homogenisationspuffer (s.u.) abgeschabt und 5 min bei 500xg zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1,5 ml Homogenisationspuffer (s.u.) suspendiert und 10 x in einem 5 ml Dounce Homogenisator homogenisiert. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 1000xg wurde der Überstand entnommen und das Pellet, wie eben beschrieben, erneut homogenisiert und zentrifugiert. Nach Vereinigung beider 1000xg Überstände erfolgte eine 1stündige Zentrifugation bei 100 000xg in einer Hitachi 65P-Zentrifuge (Rotor RP 65T). Der 100Ü wurde, wie in 2.4.1 beschrieben, aus dem Zentrifugenröhrchen entnommen und sofort in den Versuch eingesetzt.

Die Präparation eines 20 000xg Überstandes erfolgte in gleicher Weise und ist im Detail in 4.2.1 beschrieben.

Homogenisationspuffer:

50 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM K-PO₄, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA,
1 mM DTE, 2 mM Benzamidin, 250 mM Saccharose.

2.5 Herstellung von [γ -³²P]ATP

[γ -³²P]ATP wurde nach der Methode von Walseth und Johnson [112]
wie folgt hergestellt:

A Enzym-Mix I

- 20 μ l Glycerin-3-phosphat-dehydrogenase (10 mg/ml)
- 2 μ l Triosephosphat-Isomerase (10 mg/ml)
- 20 μ l Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (10 mg/ml)
- 2 μ l 3-Phosphoglyceratkinase (10 mg/ml)
- 20 μ l Lactatdehydrogenase (5 mg/ml)

Enzym-Mix I war bei 4°C lagerbar. Für die Präparation wurde
ein Aliquot von 15 μ l 10 min bei 16 000xg zentrifugiert.
Das Pellet wurde in 15 μ l 50 mM Tris-HCl pH 9 aufgenommen
= Enzym-Mix II

B Enzym-Mix III

- 5 μ l Enzym-Mix II
- 14 μ l 0,5 M Tris-HCl pH 9,0
- 7 μ l 100 mM DTE
- 109 μ l H₂O bidest

- C
- 50 μ l [³²P]Phosphat (100 mCi)
 - 5 μ l 1 M Tris-HCl pH 9,0
 - 5 μ l 240 mM MgCl₂
 - 10 μ l 65 mM DTE
 - 5 μ l 2,4 mM L- α -Glycerophosphat
 - 5 μ l 1 mM ADP
 - 5 μ l 10 mM β -NAD⁺
 - 5 μ l 20 mM Na-Pyruvat

Start mit 10 μ l Enzym-Mix III

Der Reaktionsansatz C wurde 30 min bei RT inkubiert, dann in ein Amicon-Filtrationsgefäß überführt und 15 min in einer Tischzentrifuge zentrifugiert.
Das Filtrat enthielt das $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, das sich durch eine sehr hohe spezifische Radioaktivität auszeichnete.
Für die Phosphorylierungsversuche wurde diese ATP-Lösung verdünnt und durch Zugabe von nichtradioaktivem ATP auf die im Text angegebene Konzentration eingestellt.

2.6 Enzymbestimmungen

2.6.1 CEH-Bestimmung

2.6.1.1 Synthese von Cholesterin $[\text{}^3\text{H}]\text{oleat}$

Die Synthese des Cholesterinesters erfolgte in Anlehnung an die Methode von Patel et al. [113], indem 100 μl $[\text{}^3\text{H}]\text{-}9,10(\text{n})\text{-}\text{Ölsäure}$ (ca. 0,5 mCi in Toluol) unter einem N_2 -Strom eingedampft wurden und der Rückstand nach Zugabe von 77,34 mg Cholesterin (0,2 mMol) und 56,40 mg Ölsäure (0,2 mMol) in 2,8 ml Dichlormethan gelöst wurde. Zu dieser Lösung wurden 3,05 mg 4-Pyrrolidinopyridin (0,02 mMol) [114] und 41,7 mg Dicyclohexylcarbodiimid (0,2 mMol) als Katalysatoren zugegeben, und der gesamte Ansatz wurde 12h bei RT gerührt.

Anschließend wurde die entstandene trübe Lösung unter einem N_2 -Strom auf 0,5 ml eingengt und über einen Trichter mit Wattefüllung filtriert, um den Niederschlag zu entfernen. Die Watte wurde mit 1 ml Dichlormethan nachgespült und die 1,5 ml Filtrat erneut unter N_2 auf ca. 300 μl eingengt.

Nach Auftrag des Konzentrats auf eine präparative Kieselgelplatte (Kieselgel 60 F₂₅₄/Merck) konnte durch Dünnschichtchromatographie (Laufmittel: Heptan-Diäthyläther-Essigsäure 85:15:2) das radioaktive Cholesterinoleat von den nicht reagierten Substanzen abgetrennt werden. Nach Ermittlung der Cholesterinesterfraktion mit Hilfe eines Dünnschichtscanners (Berthold LB 2722) wurde das Kieselgel des Cholesterin $[\text{}^3\text{H}]\text{oleat}$ -

Streifens mit einem sogenannten "Staubsauger" von der Platte abgeschabt und die radioaktive Substanz mit 2 x 20 ml Dichlormethan aus dem Kieselgel eluiert. Das Eluat wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt und dann in 1 ml Benzol gelöst.

Die Lösung war bei Lagerung bei -20°C stabil.

Nach dieser Präparationsmethode entstanden zwischen 20 und 30 mg Cholesterin [^3H]oleat mit einer spezifischen Radioaktivität von ca. $1,7 \times 10^6$ cpm/ μMol .

2.6.1.2 Präparation des BSA-Substrats

Ca. 400 μl des in 2.6.1.1 synthetisierten Cholesterin [^3H]oleats wurden unter einem N_2 -Strom eingedampft und der Rückstand unter Zugabe von 2 ml abs. Äthanol bei 80°C im Wasserbad gelöst. Jeweils 50 μl Portionen dieser Lösung wurden dann unter Rühren zu 50 ml 50 mM K-PO_4 pH 7,4, 1 mM EDTA, 5% BSA pipettiert [91].

Die fertige Suspension sollte 0,7 mM Cholesterin [^3H]oleat und ca. $1,2 \times 10^6$ cpm/ml enthalten.

Das BSA-Substrat wurde bei -20°C gelagert und war einige Wochen haltbar.

2.6.1.3 Durchführung des CEH-Tests

Je 0,25 ml Enzymlösung mit den im Text angegebenen Zusätzen wurden in spitzzulaufende Zentrifugengläser pipettiert und durch Zugabe von 0,15 ml BSA-Substrat (108 nMol) die Reaktion gestartet. Die Ansätze wurden sofort auf dem Whirl-Mix gemischt und 30 min (Rattensystem) bzw. 60 min (Y-1 Zellen) bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Die Abstopppung der Reaktion erfolgte durch Zufügen von 1,5 ml Methanol:Chloroform: Benzol (2,4:1:2) und 50 μl 1 N NaOH. Zur besseren Extraktion der radioaktiven Ölsäure wurden alle Ansätze 20 sec auf dem Whirl-Mix gemischt und dann 10 min bei 1500xg zentrifugiert [115]. Je 0,5 ml der oberen Phase wurden in 10 ml Toluol-

Triton-Szint (1,4 l Toluol, 0,6 l Triton X-100, 10 g PPO, 0,2 g POPOP) pipettiert und die Radioaktivität in einem Packard Tri-Carb Szintillationszähler bestimmt. Alle ermittelten CEH-Aktivitäten waren Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen und wurden in pMol/min x mg Prot. angegeben.

2.6.2 p-Nitrophenylphosphat (pNPP)-Test

Gemessen wurde die Absorptionzunahme bei 410 nm in reduzierten Glasküvetten bei 25°C in einem Perkin-Elmer-Zweistrahlspektralphotometer 550. Jeder Testansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 1 ml: 0,7 ml 50 mM Tris-HCl pH 7,0, 50 µl 0,2 M MnCl₂, 50 µl 0,4 M pNPP und 200 µl Enzym.

Die Vergleichsküvette enthielt statt der Enzymlösung Tris-Puffer.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von pNPP gestartet.

2.6.3 Proteinkinase C-Bestimmung

Der Reaktionsansatz (0,2 ml) enthielt:

50 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 µg Histone H-1, 10 mM Mg²⁺, 1 mM DTE, 0,1 mM CaCl₂, 50 µM [γ-³²P]ATP (200-400 cpm/pMol) und Enzym. Wenn im Text vermerkt, wurden 10 µg Phosphatidylserin und 1 µg Diolein zugesetzt.

Der Reaktionsstart erfolgte durch [γ-³²P]ATP-Zugabe.

Nach 15 min 30°C Inkubation wurden jeweils 50 µl auf ein Glasfaserfilterplättchen (Whatman GF/C) aufgetragen und in 25%ige TCA getaucht. Die weiteren Waschvorgänge erfolgten nach der Methode von Mans und Novelli [116]. Nach dem Trocknen der Plättchen wurde die proteingebundene Radioaktivität nach Zugabe von 5 ml Toluol-Triton-Szint (siehe 2.6.1.3) bestimmt.

2.7 Steroid-Bestimmung [117]

Je 1 ml Zellsuspension (Rattenzellen) bzw. 1 ml Kulturüberstand (Y-1 Zellen) wurde zu 5 ml Dichlormethan in ein Reagenzglas mit Stopfen überführt. Jeder Ansatz wurde dann 1 min geschüttelt und zur besseren Phasentrennung 10 min bei 1500xg zentrifugiert. Die obere Phase wurde verworfen und 2,5 ml der unteren Phase wurden mit dem gleichen Volumen Fluoreszenzreagenz (s.u.) versetzt. Der Ansatz wurde 20 sec auf dem Whirl-Mix gemischt und nach 70 min von der unteren Phase die Fluoreszenz ($\lambda_{\text{Anregung}}$: 470 nm, $\lambda_{\text{Emission}}$: 530 nm) in einem Jobin Yvon Spectrofluorometer JY 3D bestimmt.

Als Referenz diente ein Ansatz mit 1 ml KRBAG-Puffer (Rattenzellen) oder 1 ml Ham's F10 Medium (Y-1 Zellen), und als Standardlösungen wurden Corticosteron (0,25 - 1,00 nMol/ml) und Cortisol (2,5 - 10,0 nMol/ml) eingesetzt.

Alle ermittelten Corticosteroidkonzentrationen waren Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen.

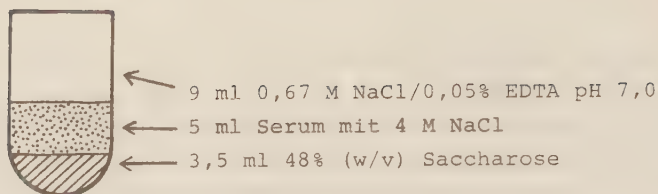
Fluoreszenzreagenz:

35 ml abs. Äthanol wurden unter Rühren tropfenweise zu 65 ml konz. H_2SO_4 pipettiert. Wegen der sehr großen Wärmeentwicklung mußte dieser Vorgang im Eisbad stattfinden. Das so hergestellte Reagenz war unter Lichtabschirmung mehrere Wochen gebrauchsfähig.

2.8 Präparation von LDL

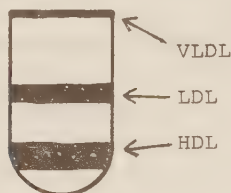
250 ml frisch entnommenes Blut wurden mit 12,5 ml 0,1 M EDTA versetzt und nach Abkühlung auf RT 2 x 10 min bei 1500xg zentrifugiert. Die Überstände (ca. 100 ml) stellten das Serum dar, aus dem nach Ultrazentrifugation die Lipoproteinfraktionen isoliert werden konnten.

Zur Auftrennung der verschiedenen Lipoproteine wurde ein Stufengradient wie folgt hergestellt:



Der Gradient wurde 1h 45 min bei 60 000 Upm in einer Sorvall OTD 65-Zentrifuge in einem Vertikal-Rotor (TV 865B) zentrifugiert [118].

Nach der Zentrifugation waren deutlich 3 Lipoproteinbanden zu erkennen:



Die Flüssigkeit wurde bis zur LDL-Bande abpipettiert und die LDL-Fraktion (ca. 50 ml von 100 ml Serum) mit einer Pasteurpipette entnommen. Das stark NaCl-haltige LDL wurde 48h gegen 3 x 5 l 10 mM MOPS pH 7,4, 0,14 M NaCl, 0,3 mM EDTA dialysiert [119] und war nach Sterilfiltration bei +4°C mehrere Wochen lagerbar.

2.9 Delipidieren von Seren

Das Delipidieren von Seren erfolgte nach der Methode von Weinstein [120], indem die Seren in Gegenwart von 3% (w/v) Cabosil 24h bei 4°C unter Rühren inkubiert wurden. Anschließend erfolgte eine 1stündige Zentrifugation bei 25 000xg in einer Sorvall RC 2-B Zentrifuge (SS 34 Rotor). Die Überstände stellten bis zu 96% Lipid-freie Seren dar und wurden nach Sterilfiltration für Zellkultur-Versuche verwendet.

2.10 Markierungsversuche mit Radioisotopen

2.10.1 [^3H]DFP-Markierung von Proteinen

200 μl Enzymlösung wurden mit 5 μl [^3H]DFP (25 μCi , 0,3 mM im Ansatz) versetzt und 12h bei 4°C inkubiert. Von 20 μl wurde, wie in 2.6.3 beschrieben, mit dem "Plättchentest" die protein-gebundene Radioaktivität bestimmt. Die restliche Lösung wurde mit dem gleichen Volumen an SDS-Probenpuffer versetzt, 15 min bei 60°C denaturiert und Aliquots auf eine SDS-PAGE aufgetragen (siehe 2.14).

2.10.2 Markierung des intrazellulären Cholesterinester-pools mit [9,10(n)- ^3H]Oleat

2.10.2.1 Herstellung des [^3H]Oleat/Albumin-Komplexes [121]

7 mg Ölsäure (25 μMol) und 60 μl [9,10(n)- ^3H]Ölsäure (300 μCi) wurden zu 25 ml abs. Äthanol, der 1% Phenolphthalein enthielt, pipettiert und die Lösung mit 1 N NaOH bis zum Umschlagspunkt des Indikators titriert. Die Äthanollösung wurde dann auf einer Heizplatte unter einem N_2 -Strom eingedampft und der Rückstand in 7,5 ml 0,9% NaCl unter Erhitzen gelöst. Anschließend wurden 12,5 ml eiskalte Albumin-Lösung (2,5 g BSA in 12,5 ml 0,9% NaCl) hinzugegeben und mit 0,9% NaCl auf 25 ml aufgefüllt.

Der so präparierte Komplex enthielt 1 mM [^3H]Oleat (10^4 cpm/nMol) und wurde für den Markierungsversuch eingesetzt.

2.10.2.2 Inkubationsbedingungen während der Markierung

Y-1 Monolayer wurden nach 5 Tagen Wachstum auf 2 cm $\varnothing$ Petrischalen 24h in Ham's F10 Medium mit delipidierten Seren (15% Pferdeserum, 2,5% FKS) (siehe 2.9) inkubiert. Am 7. Tag erfolgte eine 24stündige Inkubation in je 2 ml Ham's F10 pro Petrischale, das LDL (60 $\mu\text{g/ml}$) und 0,1 mM [^3H]Oleat (10^4 cpm/nMol) in einer Albumin-Lösung (siehe 2.10.2.1) enthielt.

2.10.2.3 Bestimmung des intrazellulären Cholesterin[³H]oleats [122]

Nach Abnahme des radioaktiven Mediums wurden die Zellen 2 x mit Ham's F10 gewaschen und ggf. nochmals in Ham's F10 mit den im Text angegebenen Zusätzen inkubiert.

Pro Meßpunkt wurde dann das Medium von 4 Petrischalen vereinigt und für die Steroidbestimmung verwendet, die Monolayer wurden 2 x mit Hank's Lösung gewaschen und mit einem Rubber Policeman abgeschabt. Nach 5 min Zentrifugation bei 500xg wurde das Zell-pellet in 0,2 ml H₂O bidest suspendiert. 2 x 0,1 ml der Suspension wurden mit je 4 ml Chloroform:Methanol (2:1) versetzt und 30 min bei RT stehengelassen. Zur besseren Phasentrennung wurden je 0,9 ml H₂O bidest hinzugefügt, und nach Mischen auf dem Whirl-Mix wurden die Ansätze 5 min bei 1500xg zentrifugiert. Je 2 ml der unteren Phasen der beiden Ansätze wurden vereinigt und unter einem N₂-Strom eingedampft. Der Rückstand wurde in 70 µl Chloroform:Methanol (2:1) gelöst, wovon 50 µl auf eine DC-Alufolie Kieselgel 60-Platte (Merck) aufgetragen wurden. Nach Dünnschichtchromatographie in Heptan:Diäthyläther:Essigsäure (85:15:2) wurden die Lipidflecke durch Joddämpfe ange-färbt, der Cholesterin[³H]oleat-Fleck (Rf ~ 0,9) aus der Platte herausgeschnitten und nach Zugabe von 10 ml Toluol-Triton-Szint die Radioaktivität bestimmt.

2.11 Säulenchromatographie

Alle Säulenchromatographien wurden bei +4°C durchgeführt und, um konstante Durchflußraten zu erzielen, wurden motorgetriebene Pumpen (10200 Perpex/LKB) verwendet. Die Proteinabsorption bei 280 nm wurde während der Säulenzläufe mittels eines mit einem Schreiber gekoppelten Durchflußphotometers (ISCO, Modell UA-5) verfolgt.

2.11.1 Gelchromatographie an Sephadex G25

Die benutzte Säule (1,5 cm Ø) wurde 17 cm hoch mit nach den Angaben des Herstellers vorgequollenem Sephadex G25 gefüllt. Als Säulenpuffer diente, wenn nicht anders im Text vermerkt, 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTE, 5 mM Benzamidin. Vor dem Auftrag von 1-2 ml 100Ü bzw. 20Ü war das Gelmaterial mit dem 4fachen Säulenvolumen des oben genannten Puffers äquilibriert worden. Die Flußrate betrug 60 ml/h, und je nach Versuch wurden 1-2 ml Fraktionen gesammelt.

2.11.2 Gelchromatographie an Sepharose Cl-6B

Das Gelmaterial wurde in 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTE, 1 mM Benzamidin äquilibriert und in eine Säule (1,4 cm x 105 cm) gefüllt. Nach Spülen der Säule mit dem 4fachen Säulenvolumen an Puffer wurden 2 ml 100Ü bzw. 20Ü auf die Säule aufgetragen und die Proteine mit dem gleichen Puffer eluiert. Die Flußrate während des Spülvorgangs und der Elution betrug 15 ml/h bei einer Fraktionsgröße von 2,7 ml.

2.11.3 Gelchromatographie an Sephacryl S-300

Die Säule (1,4 cm x 105 cm) wurde nach den Angaben des Herstellers gepackt und mit dem 4fachen Säulenvolumen an 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTE, 0,5 mM Benzamidin äquilibriert. Nach dem Auftrag von 2 ml 100Ü wurden die Proteine mit dem gleichen Puffer eluiert. Bei einer Flußrate von 15 ml/h wurden 2,8 ml Fraktionen gesammelt.

2.11.4 Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose (DE 52)

Das vorgequollene Gelmaterial wurde in eine 1,0 cm x 8,0 cm hohe Säule gefüllt und mit 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 5 mM EDTA,

5 mM EGTA, 1 mM DTE, 2 mM Benzamidin (Puffer A) äquiliibriert. Nach Auftrag von 4,5 mg Protein und Erhalt der Durchlaufaktionen wurde die Säule mit 100 ml Puffer A unter Zusatz von 10^{-5} M cAMP (Puffer B) gespült und anschließend mit einem linearen 0-400 mM KCl-Gradienten (100 ml) in Puffer B die Proteinkinase C eluiert. Das Volumen der Fraktionen betrug 5 ml.

2.11.5 Kationenaustauschchromatographie an Phosphocellulose P-11

Die Phosphocellulose wurde nach den Angaben des Herstellers vorbehandelt und nach Äquilibrierung in 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTE, 5 mM Benzamidin im Batch-Verfahren verwendet. Die gebundenen Proteine wurden mit dem gleichen Puffer in Gegenwart von 0,5 M NaCl eluiert.

2.12 Entsalzung durch Mikrozentrifugation

1 ml Proteinlösung wurde auf eine mit Sephadex G50 gefüllte 5 ml Spritze aufgetragen. Nach Einzug der Flüssigkeit in das Gelbett wurde 1 min bei 500xg zentrifugiert, anschließend wurde 1 ml Puffer (s.u.) aufgetragen und nochmals zentrifugiert. Die abzentrifugierte Flüssigkeit war von Cofaktoren und Salzen befreite Proteinlösung [123]. Zur Äquilibrierung und Spülen des Gelmaterials wurden 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTE, 5 mM Benzamidin oder der gleiche Puffer mit Zusatz von 100 mM $K-PO_4$ verwendet.

2.13 Proteinbestimmungsmethoden

2.13.1 Proteinbestimmung nach Bradford [124]

100 mg Serva Blau G-250 wurden in 50 ml 95%igem Äthanol bei ca. 40°C im Wasserbad gelöst. Nach Zugabe von 100 ml 85%iger ortho-Phosphorsäure wurde mit H_2O bidest auf 200 ml aufgefüllt.

Dieses Konzentrat war bei $+4^{\circ}\text{C}$ im Kühlraum haltbar.

Für die Proteinbestimmung wurde es 1:5 mit H_2O bidest verdünnt. Zu je 5 ml Reagenz wurden 100 μl Probe (10-100 μg Protein) zugefügt, gemischt und nach 10 min die OD_{595} bestimmt.

Als Eichprotein wurde BSA verwendet.

2.13.2 Modifizierte Proteinbestimmung nach Lowry [125]

Zur Ermittlung des Proteingehaltes von Lipoproteinen des Serums wurde eine nach Lowry modifizierte Bestimmung durchgeführt:

Lösung A: 2,0% Na_2CO_3
 0,4% NaOH
 0,16% Na-Tartrat
 1% SDS

Lösung B: 4% $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$

Lösung C: 100 Teile A + 1 Teil B

1 ml Probe (10-100 μg Protein) wurde mit 3 ml Lösung C 10-60 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 0,3 ml Folin-Ciocalteus-Reagenz (1:1 mit H_2O bidest verdünnt) erfolgte eine weitere Inkubation für 45 min bei RT, anschließend wurde die Absorption bei 660 nm gemessen.

2.14 Slabgel-Polyacrylamid-Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (SDS-PAGE) nach Laemmli [126]

Es wurden Plattengele (140 x 130 x 2 mm) mit einer Trenngelkonzentration von 7,5% und 10% Acrylamid benutzt. Die verwendeten Lösungen wurden wie folgt hergestellt:

1. Trenngelpuffer:

181,7 g Tris/l (mit HCl -konz. auf pH 8,8 eingestellt)

2. Sammelgelpuffer:

60,6 g Tris/l (mit HCl -konz. auf pH 6,8 eingestellt)

3. Acrylamid-Lösung, 20%ig:
200 g Acrylamid (2 x umkristallisiert) und 5,33 g Bisacrylamid/1 H₂O bidest
4. Ammoniumpersulfat-Lösung, 10%ig:
100 mg (NH₄)₂S₂O₈/ml H₂O bidest
5. SDS-Lösung, 20%ig:
20 g Na-Dodecylsulfat/100 ml H₂O bidest
6. Probenpuffer:
10 ml Glycerin, 5 ml β -Mercaptoäthanol, 3 g SDS
12,5 ml Sammelgelpuffer und 0,2 g Bromphenolblau in
100 ml H₂O bidest
7. Elektrodenpuffer:
6 g Tris, 28,8 g Glycin und 2 g SDS pro 2 l H₂O bidest,
pH 8,3
8. Färbelösung:
2,5 g Serva Blau R-250, 455 ml Methanol, 90 ml Eisessig,
mit H₂O bidest auf 1 l auffüllen
9. Entfärbelösung:
300 ml Methanol, 75 ml Eisessig, auf 1 l mit H₂O bidest
auffüllen

A Trenngelmischung

Lösung	ml Lösung/Gel	
	10%	7,5%
1	7,5	7,5
3	15,0	11,25
4	0,2	0,2
5	0,225	0,225
TEMED	0,02	0,02
H ₂ O bidest	7,5	11,25

B Sammelgelmischung

Lösung	ml Lösung/Gel
2	4,0
3	4,0
4	0,16
5	0,24
TEMED	0,016
H ₂ O bidest	7,76

Die zu analysierenden Proben wurden mit dem gleichen Volumen an SDS-Probenpuffer versetzt, 15 min bei 60°C denaturiert und maximal 100 µl pro Slot auf das Gel aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte bei RT bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA pro Gel, und es dauerte ca. 4-6h, bis die Bromphenolblaubande die untere Trenngelgrenze erreicht hatte.

Die Gele wurden anschließend 3h in Lösung 8 gefärbt und dann unter mehrmaligem Wechsel der Lösung 9 entfärbt.

2.15 Autoradiographie und Fluorographie von Slab-Gelen

Für die Fluorographie wurden die Gele vor dem Trocknen 2 x 30 min in Enhancer gelegt und anschließend 2 x 15 min gewässert.

Alle nachfolgenden Schritte waren für die Autoradiographie und Fluorographie identisch.

Nach dem Entfärben bzw. Wässern wurden die Gele für ca. 1,5h auf dem Gelrockner (Modell 224, Bio-Rad) getrocknet und anschließend mit Plastik-Haushaltsfolie umwickelt. Bei Rotlicht wurde ein Röntgenfilm auf die getrockneten Gele gelegt, und zur Markierung der genauen Position des Filmes wurden Film und Gel mittels einer Stecknadel an 2 Stellen durchstoßen. Die Belichtung erfolgte bei -70°C in einer Filmkassette (Dr. Goss).

Entwicklung des Röntgenfilms (bei Rotlicht)

1. 5 min entwickeln (Entwickler LX 24, 1:5 verdünnt mit H_2O bidest)
2. 30 sec wässern
3. 10 min fixieren (Fixierer AL 4, 1:5 verdünnt mit H_2O bidest)
4. 30 min wässern
5. an der Luft trocknen

Auswertung der Autoradiogramme und Fluorogramme

Methode A

Bestimmung der geschwärzten Banden durch Absorptionsmessung bei 550 nm mittels eines mit einem Schreiber gekoppelten Beckmann Spektralphotometers Acta T.M.III.

Methode B

Auswertung mit dem 2202 UltroScan Laser Densitometer der Firma LKB mit eingebautem Integrator (Hewlett-Packard 3390 A).

Methode C

Auswertung mit dem 2202 UltroScan Laser Densitometer der Firma LKB in Verbindung mit der LKB Gel Scan software und dem PC Apple II Mikrocomputer.

2.16 Leitfähigkeitsmessung

Die Bestimmung der Leitfähigkeit der KCl-haltigen Fraktionen der DE 52-Säule erfolgte mit dem Conductivity Meter CDM 3 der Firma Radiometer, Kopenhagen.

2.17 pH-Messungen

Zur Bestimmung des pH-Wertes von Puffern und anderen Lösungen diente das Phillips pW 9410 digital pH Meter.

3. ERGEBNISSE - TEIL A

Untersuchungen an der Nebenniere der Ratte

3.1 Steroidogenese in suspendierten Nebennierenzellen

3.1.1 Excitations- und Emissionsspektrum von Corticosteron

Die Zona fasciculata-reticularis Zellen der Rattennebenniere produzieren neben einigen anderen Steroidhormonen als Hauptprodukt das Glucocorticoid Corticosteron [5], welches leicht durch einen Fluoreszenztest nachweisbar ist [127] (siehe 2.7).

Wie die Abb. 4 zeigt, wird dieses Corticosteroid von Photonen der Wellenlänge 470 nm maximal angeregt (4A), die aufgenommene Energie wird als Licht der Wellenlänge 510 nm wieder abgegeben (4B).

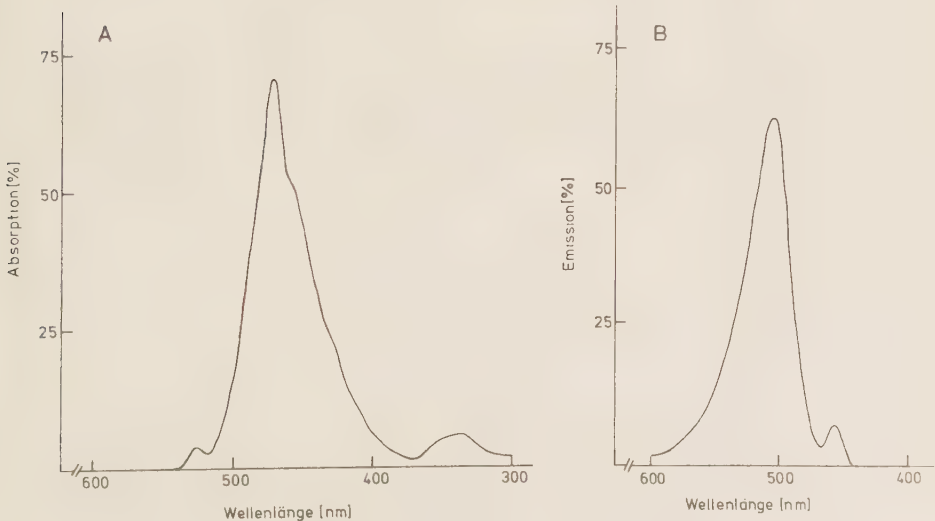


Abb. 4: A Excitationsspektrum von Corticosteron
B Emissionsspektrum von Corticosteron

Für die aufgezeichneten Spektren wurde 1 nMol Corticosteron in das unter 2.7 beschriebene Fluoreszenzreagenz überführt und 70 min nach Zugabe Absorption und Emission bestimmt. In den ersten 60 min nahm die Fluoreszenz kontinuierlich zu und blieb erst dann konstant, so daß, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, alle nachfolgenden Messungen 70 min nach Überführung der Probe in das Fluoreszenzreagenz durchgeführt wurden.

3.1.2 Dosis-Wirkungs - Kurve von ACTH und db cAMP

Abb. 5 zeigt die Abhängigkeit der Steroidausschüttung von der ACTH- und db cAMP-Konzentration im Inkubationsansatz. Die Zellpräparation erfolgte wie unter 2.2.1 beschrieben, und nach einer Inkubation von 30 min (siehe 2.2.2) wurde der Gehalt an Corticosteroiden bestimmt (siehe 2.7).

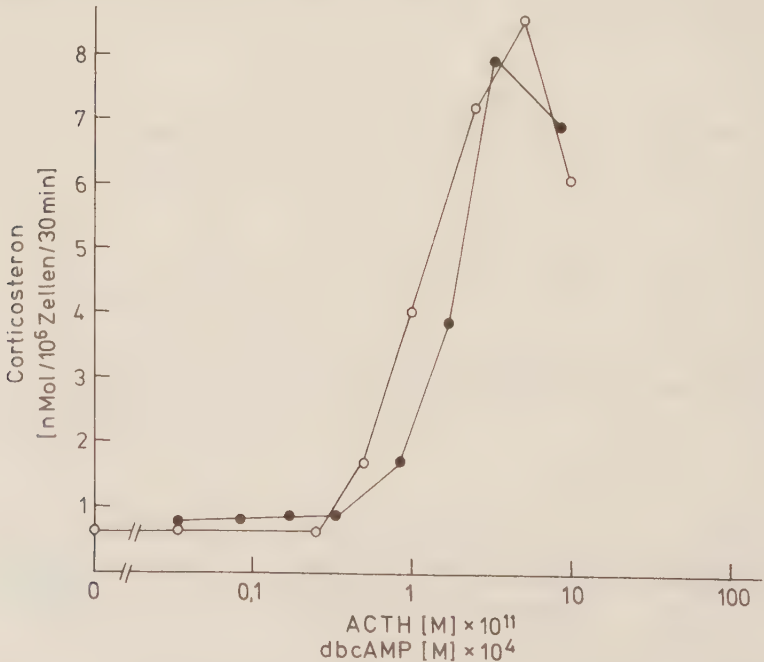


Abb. 5: Dosis-Wirkungs-Kurve von ACTH und db cAMP

● — ● ACTH, 7,65 mM Ca²⁺
○ — ○ db cAMP

Die Corticosteron-Produktion zeigte eine sigmoide Dosis-Wirkungs-Kurve mit einem Maximum bei einer ACTH-Konzentration von 34 pM (100 pg/ml) und einer db cAMP-Konzentration von 0,5 mM. Bei noch höheren Konzentrationen dieser beiden steroidogenen Substanzen kam es wieder zu einer Verminderung der Steroidausschüttung. Ähnliche Kurvenverläufe wurden auch schon von Trzeciak und Mathé [109] gezeigt, wobei die Autoren jedoch kein Abknicken der Kurven bei hohen Konzentrationen beobachteten.

3.1.3 Ca^{2+} -Abhängigkeit der ACTH- und db cAMP-induzierten Steroidogenese

Wie auch von anderen Autoren an isolierten Nebennierenzellen der Ratte beschrieben [109,128], zeigte die ACTH-induzierte Steroidogenese eine starke Ca^{2+} -Abhängigkeit. Maximale Steroidsekretion wurde erst bei einer Ca^{2+} -Konzentration ≤ 5 mM erzielt, wohingegen die db cAMP-induzierte Corticosteron-Produktion Ca^{2+} unabhängig war (Abb. 6).

Wenn nicht ausdrücklich vermerkt, enthielten alle nachfolgenden ACTH-Inkubationsansätze 7,65 mM Ca^{2+} , und bei allen db cAMP-Ansätzen wurde auf eine Ca^{2+} -Zugabe verzichtet. Hohe Ca^{2+} -Konzentrationen allein hatten keinen Einfluß auf die Basalrate der Steroidogenese.

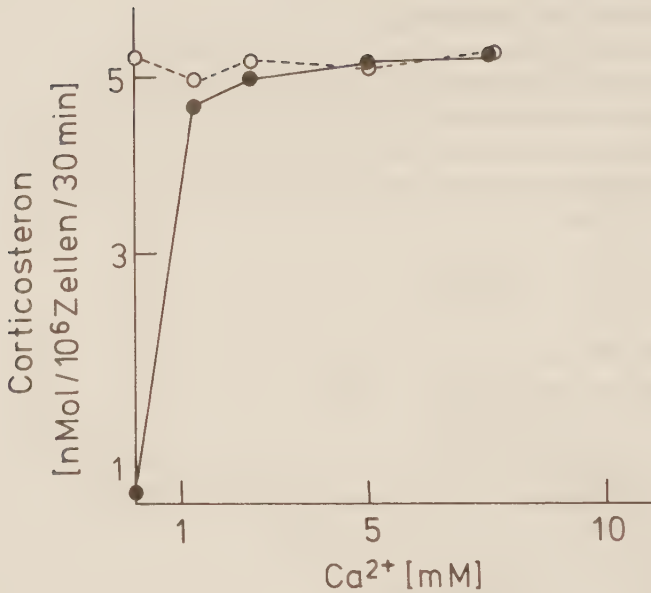


Abb. 6: Ca²⁺-Abhängigkeit der ACTH (● — ●)- und db cAMP (○ - - - induzierten Steroidogenese

Die Inkubation erfolgte nach 2.2.2 in Gegenwart von 34 pM ACTH bzw. 0,5 mM db cAMP.

3.1.4 Effekt der Dexamethasongabe auf die Steroidogenese

3 Tage vor der Herstellung der Zellsuspension (siehe 2.2.1) wurde einer Rattengruppe Dexamethason (20 mg/l) dem Trinkwasser zugesetzt, um die ACTH-Sekretion zu supprimieren [129]. In den isolierten Zellen von Dexamethason-behandelten und -unbehandelten Tieren wurde dann routinemäßig die Steroidsekretion mit und ohne Zugabe von ACTH (34 pM) bestimmt (Tab. 1).

Die Basalrate der Steroidogenese konnte durch Dexamethason-gabe um das 7fache gesenkt werden, da diese Zellen nicht durch endogenes ACTH aktiviert waren; auf die maximale Corticosteronausschüttung hatte diese Behandlung bei der in vitro-Aktivierung jedoch keinen Einfluß.

Durch die sehr niedrige Basalaktivität wurde bei den Dexamethason-behandelten Ratten eine 34fache Stimulierung durch ACTH beobachtet.

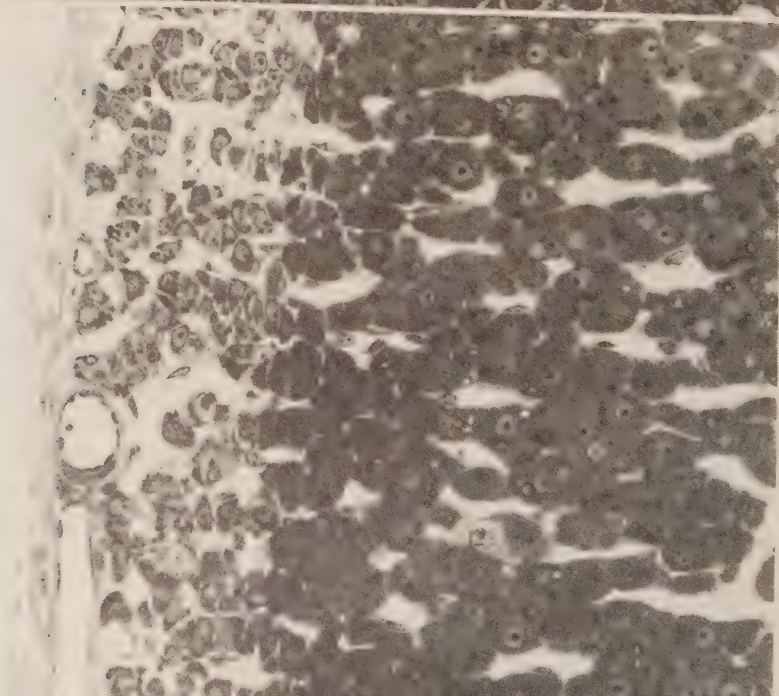
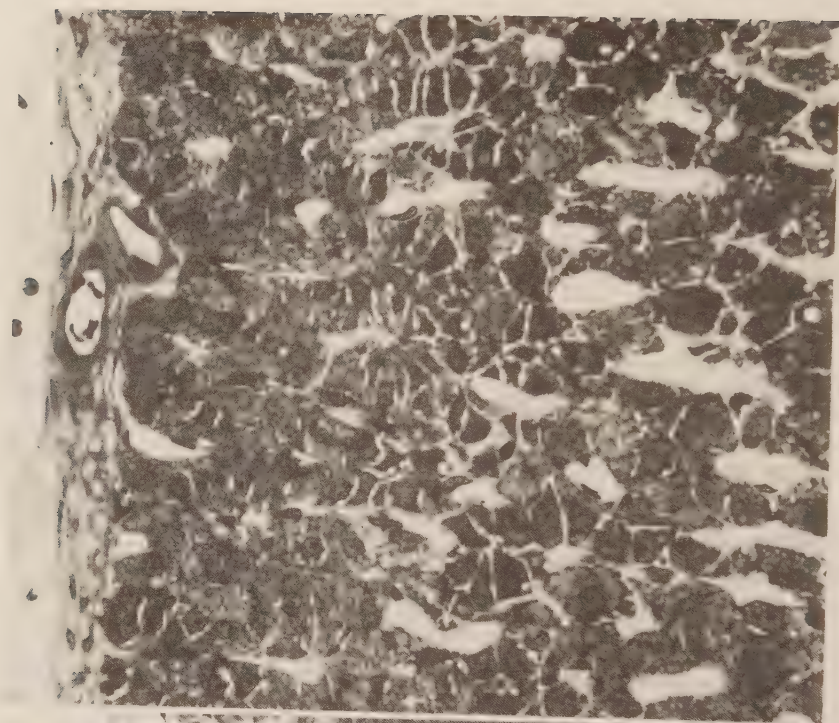
Leider konnten bei diesem Versuch keine Mittelwerte oder Standardabweichungen berechnet werden, da die absoluten Werte in der Corticosteroidausschüttung von der Güte der Zellpräparation abhingen, die oft sehr starken Schwankungen unterlag. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund könnten die je nach Präparation unterschiedlich ausgebildeten "gap junction"-ähnlichen Verbindungen sein, die für eine Kommunikation zwischen den Zellen sorgen (siehe Diskussion 5.2).

Bei sehr guten Zellpräparationen wurden z.T. Stimulierungsfaktoren von über 90 erzielt.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Schnitten durch eine Nebenniere einer mit Dexamethason-behandelten Ratte im Vergleich zu einem unbehandelten Tier zeigt die Abb. 7.

Bei Dexamethasongabe fand man in den hier abgebildeten Zona fasciculata Zellen eine starke Ansammlung von Lipidtropfen (Abb. 7A,C), ohne Dexamethason war die ACTH-Sekretion in der lebenden Ratte so hoch, daß diese Lipidspeicher fast alle abgebaut waren (Abb. 7B,D). Die hohe ACTH-Sekretion mag darauf zurückzuführen sein, daß die Tiere oftmals einem Kältestreß ausgesetzt waren.

In der Zona glomerulosa konnte kein Unterschied im Lipidgehalt zwischen beiden Tiergruppen beobachtet werden.



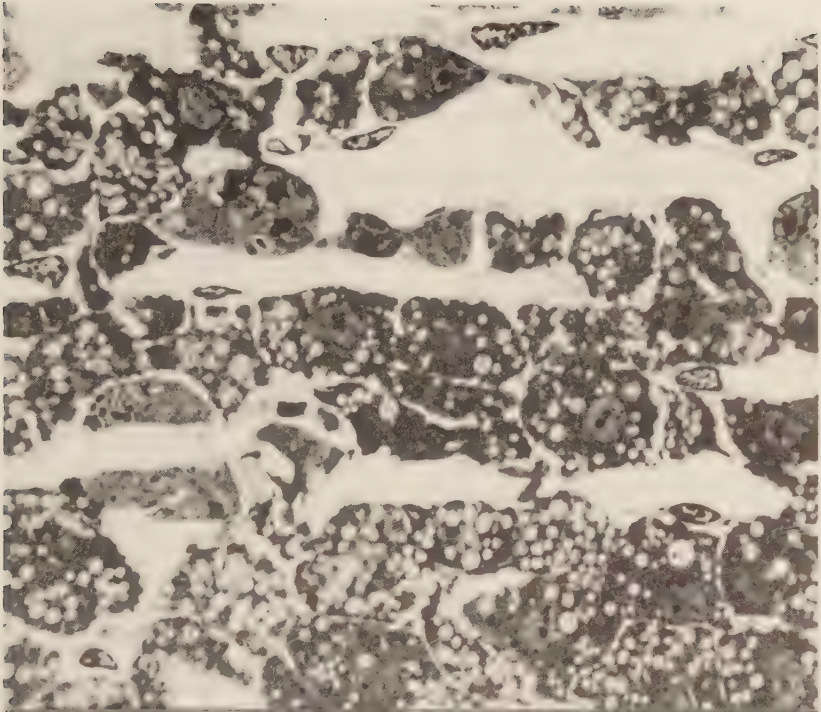


Abb. 7C



Abb. 7D

Abb. 7: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Schnitten durch eine Nebennierenrinde der Ratte

- A Nebennierenrinde einer mit Dexamethason behandelten Ratte (700fache Vergr.)
- B Nebennierenrinde eines unbehandelten Tieres (700fache Vergr.)
- C Ausschnitt aus der Zona fasciculata von A (1500fache Vergr.)
- D Ausschnitt aus der Zona fasciculata von B (1500fache Vergr.)

Tabelle 1 Einfluß von Dexamethason auf die Steroidsekretion

	keine Dexamethasongabe		Dexamethasongabe	
	Corticosteron [nMol/10 ⁶ Zellen/30 min]	Stimulierungs- faktor	Corticosteron [nMol/10 ⁶ Zellen/30 min]	Stimulierungs- faktor
Basalrate	2,26	1,0	0,30	1
ACTH	10,00	4,4	10,20	34

Die Inkubation erfolgte nach 2.2.2 in Gegenwart bzw. Abwesenheit von 34 pM ACTH und 7,65 mM Ca²⁺.

3.1.5 Inhibierung der ACTH-induzierten Steroidogenese durch TFP

In diesem Versuch wurde die Wirkung von TFP, einem Inhibitor der Proteinkinase C [130] und von Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen [131], auf die ACTH-induzierte Steroidogenese untersucht.

Abb. 8 zeigt die Corticosteron-Sekretion von suspendierten Nebennierenzellen bei Zusatz von 10^{-5} bis 10^{-3} M TFP in den Inkubationsansatz. Halbmaximale Hemmung der Steroidogenese wurde bei einer Inhibitorkonzentration von 4×10^{-5} M beobachtet.

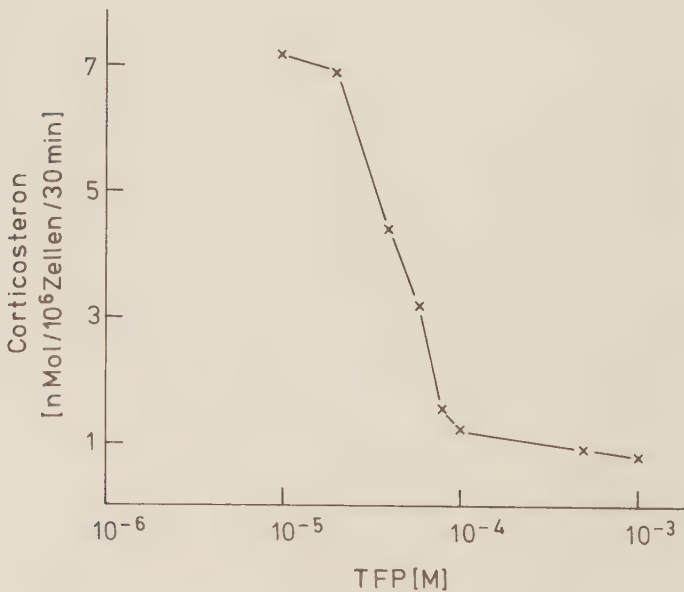


Abb. 8: Abhängigkeit der Corticosteron-Sekretion von der TFP-Konzentration

Die Inkubation erfolgte nach 2.2.2 in Gegenwart von 34 pM ACTH, 7,65 mM Ca^{2+} und TFP in den angegebenen Konzentrationen

3.2 In vitro-Untersuchungen zur Regulation der CEH im 100 Ü

3.2.1 Bestimmung der CEH-Aktivität mit dem radioaktiven BSA-Test

Die CEH ist ein Grenzphasenenzym, bei dem die katalysierte Reaktion an der Grenze von Lipidtropfen und Wasserphase abläuft. Bei solchen Enzymen besteht immer die Schwierigkeit, einen geeigneten in vitro-Test aufzubauen, bei dem mit einer Substratform gearbeitet wird, die der in vivo äquivalent ist.

Für die CEH-Messungen wurde bei den nachfolgenden Untersuchungen ein Substrat verwendet, bei dem das Cholesterinoleat in einem BSA enthaltenen Phosphatpuffer suspendiert war. Die Herstellung des Substrates erfolgte nach 2.6.1.2.

Durch die CEH wurde das Cholesterinoleat, das im Ölsäurerest mit Tritium markiert war, gespalten, und die radioaktive Ölsäure konnte anschließend aus dem Testansatz, wie in 2.6.1.3 beschrieben, extrahiert werden. Eine Schwierigkeit, die sich bei diesen Bestimmungen ergab, war der Vergleich von absoluten Enzymaktivitäten aus verschiedenen Versuchen.

Die absoluten Aktivitäten waren nämlich einerseits abhängig von der Substrat-Charge, andererseits wurden auch je nach Alter des Substrates unterschiedliche Aktivitäten bestimmt. Außerdem hatten die Lagerungstemperatur (siehe 3.2.3.1) und die Pufferbedingungen (siehe 3.2.3.5) entscheidenden Einfluß auf die Ergebnisse.

Hieraus wurde ersichtlich, daß das synthetisierte Substrat wahrscheinlich seine Form variieren konnte und somit das Cholesterinoleat nicht immer gleich gut für die CEH zugänglich war (siehe Diskussion 5.1). Das Fazit, das man aus diesen Beobachtungen schließen mußte, war, daß es nur in einem sehr begrenzten Umfang möglich war, spezifische Aktivitäten und z.T. auch prozentuale Angaben aus unterschiedlichen Versuchen miteinander zu vergleichen.

3.2.1.1 Substratabhängigkeit

Die Abhängigkeit der CEH-Aktivität von der zugesetzten Menge an BSA-Substrat gibt die Abb. 9 wieder.

100 μ l Substrat entsprachen dabei 72 nMol Cholesterinoleat. Für den Test wurden 50 μ l 100 U (250 μ g Protein) eingesetzt, die 30 min bei 37°C, wie in 2.6.1.3 beschrieben, inkubiert wurden.

Das Ergebnis zeigte, daß bei Zugabe von mehr als 50 μ l BSA-Substrat (36 nMol Cholesterinoleat) die Enzymaktivität nur noch geringfügig anstieg.

Um auch bei noch höheren Proteinkonzentrationen im Sättigungsbereich zu sein, wurde bei den nachfolgenden Messungen jedoch nicht 50 μ l, sondern 150 μ l BSA-Substrat eingesetzt.

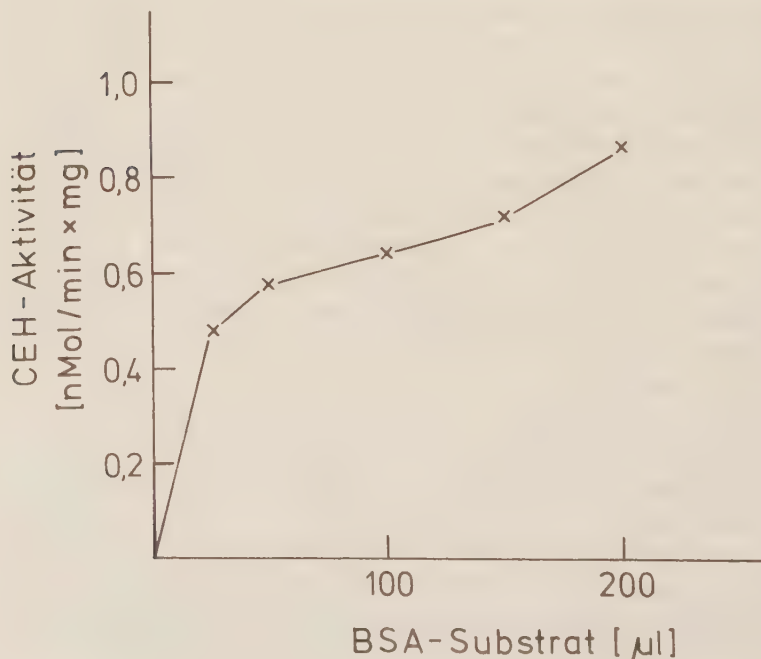


Abb. 9: Abhängigkeit der CEH-Aktivität im 100 U von der Menge an zugesetztem BSA-Substrat

3.2.1.2 Zeitabhängigkeit

Nachteilig bei der Bestimmung der Enzymaktivität war, daß keine kontinuierliche Reaktionskinetik verfolgt werden konnte, da der Test auf einer Endproduktbestimmung beruhte, d.h. es konnte nur die Menge an gebildetem Oleat in einer definierten Zeiteinheit bestimmt werden.

Abb. 10 gibt diese Abhängigkeit wieder.

Es wurden jeweils 50 µl 100 Ü (250 µg Protein) mit 100 µl bzw. 150 µl BSA-Substrat bis zu 1 h bei 37°C inkubiert. Es zeigte sich, daß die CEH-Aktivität zwischen 10 und 60 min Inkubationsdauer linear anstieg, so daß aufgrund dieses Ergebnisses für Routinebestimmungen eine Inkubationszeit von 30 min festgesetzt wurde. Wie in Abb. 9 war die Enzymaktivität, getestet mit 150 µl BSA-Substrat, geringfügig höher, ansonsten hatte die Menge an zugesetztem Substrat jedoch keinen Einfluß auf die Kinetik.

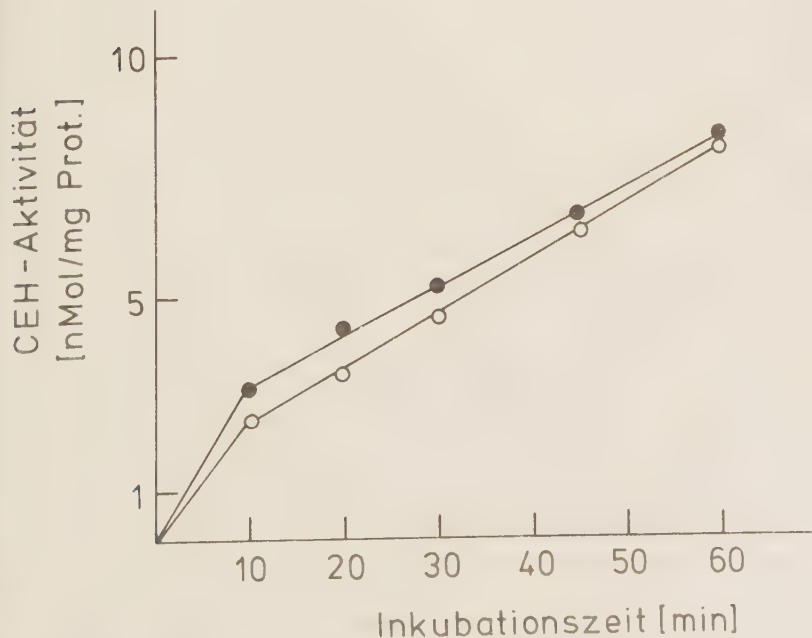


Abb. 10: Zeitabhängigkeit des BSA-Tests

● — ● 150 µl BSA-Substrat pro Ansatz
○ — ○ 100 µl BSA-Substrat pro Ansatz

3.2.1.3 Proteinabhängigkeit

Die Abhängigkeit der CEH-Aktivität von der in den Test eingesetzten Proteinmenge ist in Abb. 11 dargestellt. Die Durchführung des Tests erfolgte nach 2.6.1.3. Wie man der Abbildung entnehmen kann, stieg die CEH-Aktivität bis zu der maximal eingesetzten Proteinkonzentration von 750 μg (150 μl 100 Ü) linear an.

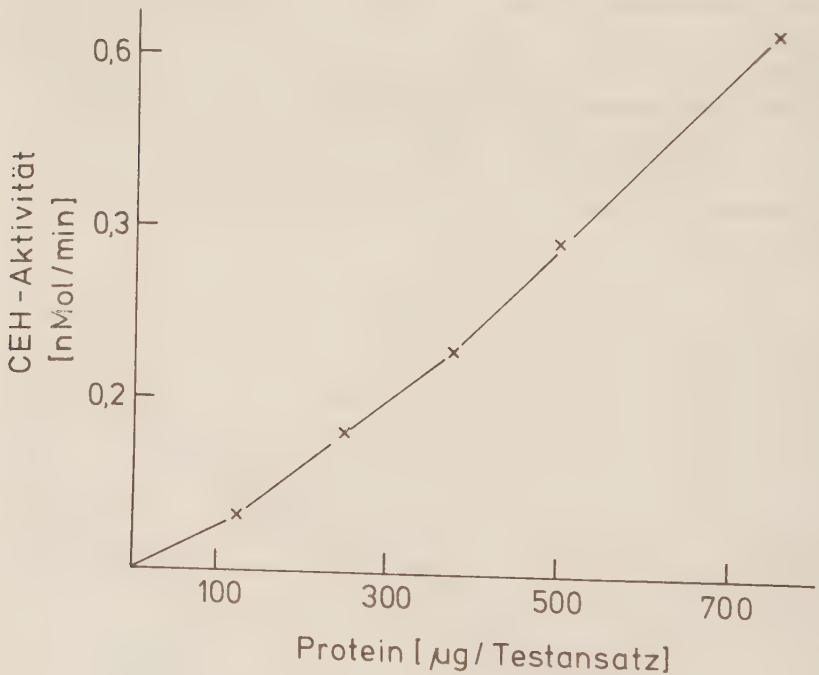


Abb. 11: CEH-Aktivität im 100 Ü in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration

3.2.2 Gelfiltration eines 100 Ü an Sephacryl S-300

Nach Auftrag von 2 ml 100 Ü (10 mg Protein) auf eine Sephacryl S-300 Säule (105 cm x 1,4 cm) und Elution des Proteins ergab sich das in Abb. 12 dargestellte Profil. Neben der CEH-Aktivität wurde auch die Phosphataseaktivität mit pNPP bestimmt.

Nach Analyse der einzelnen Fraktionen ergaben sich sowohl zwei unterschiedliche Esterase- als auch zwei Phosphatasepeaks. Der größte Teil der CEH-Aktivität eluierte im Ausschlußvolumen V_0 und war durch keine mit pNPP meßbare Phosphataseaktivität verunreinigt. Die restlichen 30% chromatographierten mit der Hauptphosphatase-Aktivität in einem Molekulargewichtsbereich von 300 000 bis 500 000 Da.

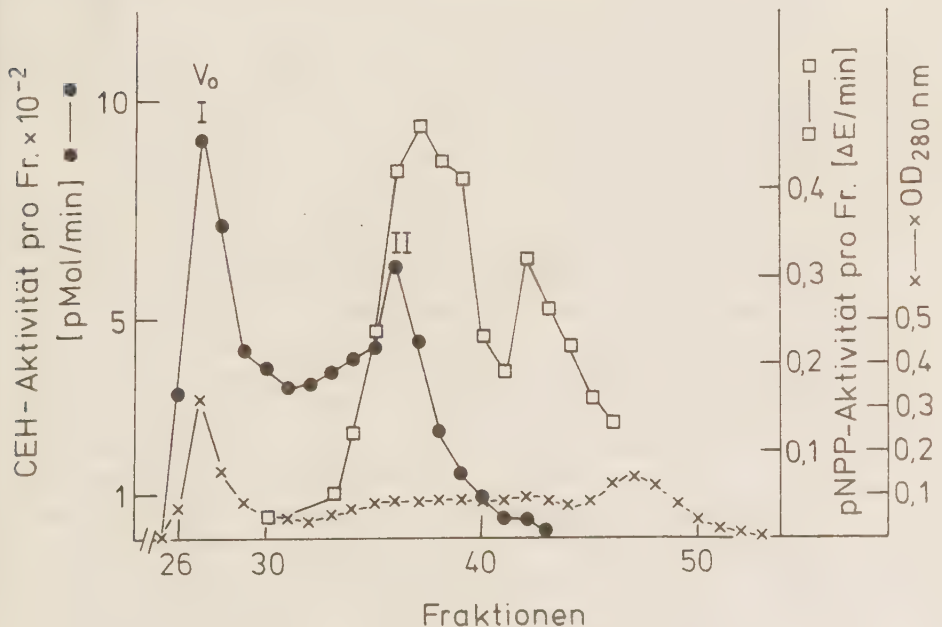


Abb. 12: Gelchromatographie von 100 Ü an Sephacryl S-300
Die CEH(-●-) und die pNPP(-□-) Aktivitäten wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, bestimmt. Weitere Einzelheiten siehe Text.

Es wurde jedoch festgestellt, daß der prozentuale Anteil der CEH-Aktivität in Peak I und II je nach Präparation des 100 Ü variieren konnte.

Die beiden unterschiedlichen molekularen CEH-Formen sind wahrscheinlich auf verschiedene Aggregationsformen des Enzyms mit Lipiden zurückzuführen [91,98].

Identifizierung des CEH-Polypeptids auf der SDS-PAGE
mittels [³H]DFP-markierter Sephacryl S-300 Fraktionen

Die CEH besitzt in ihrem katalytischen Zentrum einen Serinrest und ist somit durch DFP inhibierbar [98] bzw. kann durch [³H]DFP markiert werden [86,98,99]. Diese radioaktive Markierung war für die Identifizierung der CEH-Untereinheit auf der SDS-PAGE eine wertvolle Hilfe.

100 Ü und verschiedene Fraktionen der Sephacryl S-300 Säule wurden 12 h bei 4°C mit [³H]DFP markiert (siehe 2.10.1), anschließend wurden die Proben mit SDS-Probenpuffer versetzt, denaturiert und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach Proteinanfärbung und Fluorographie ergab sich die Abb. 13.

Der 100 Ü zeigte in dem aufgetrennten Molekulargewichtsbereich 3 [³H]DFP markierte Banden (MG: 84 kDa, 75 kDa, 23 kDa). Diese 3 Banden konnten durch Chromatographie an der Sephacryl S-300 Säule getrennt werden. Der Pool der Fraktionen 34-37 (Peak II der CEH) zeigte nur eine [³H]DFP markierte Bande mit einem Molekulargewicht von 84 kDa. In den späteren Fraktionen eluierten die beiden anderen markierbaren Proteine, so daß der CEH in Übereinstimmung mit dem Molekulargewicht des Enzyms aus der Rindernebenniere [99] die 84 kDa-Untereinheit zugeordnet werden konnte.

Peak I der CEH war wegen des sehr hohen Lipidanteils nicht durch [³H]DFP markierbar.

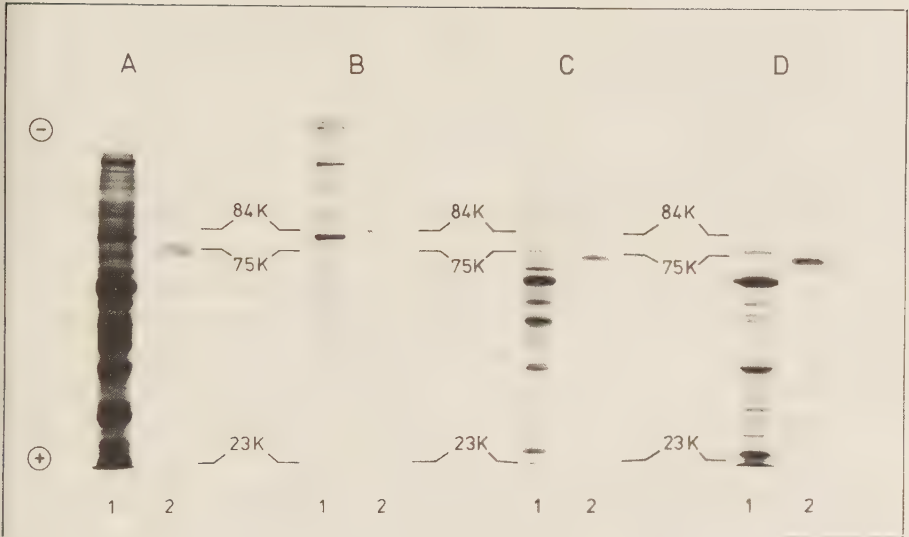


Abb. 13: SDS-Gelelektrophorese (10% Acrylamid) und Fluorographie vom 100 Ü und den Sephacryl S-300 Fraktionen

Spalte 1: Proteinfärbung

Spalte 2: Fluorographie der $[^3\text{H}]\text{DFP}$ markierten Proben

A 100 Ü : (1) 100 µg
(2) 100 µg, 16300 cpm

B Fr.34-37: (1) 52 µg
(2) 52 µg, 2900 cpm

C Fr.38-41: (1) 92 µg
(2) 92 µg, 6200 cpm

D Fr.47-52: (1) 108 µg
(2) 108 µg, 7200 cpm

Als Eichproteine zur Molekulargewichtsbestimmung wurden Phosphorylase b (97 kDa), Transferrin (80 kDa), BSA (68 kDa), Pyruvatkinase (57 kDa) und Ovalbumin (43 kDa) verwendet.

3.2.3 Versuche zur Aktivierung der CEH

Da in vivo eine cAMP-abhängige Phosphorylierung der CEH postuliert wird [91-96], sollte dieser Regulationsmechanismus in vitro durch Aktivitätsmessungen im 100 Ü nach Zugabe der Cofaktoren Mg^{2+} , ATP und Mg^{2+} , ATP, cAMP näher untersucht werden.

Ein typisches Aktivierungsschema ist in Tab. 2 wiedergegeben. Es zeigt die Grundaktivität der CEH und die Aktivitäten in Gegenwart von Mg^{2+} , Mg^{2+} , ATP und Mg^{2+} , ATP, cAMP während des 30 min CEH-Testes.

Im Gegensatz zu den CEH-Bestimmungen im Rindersystem [94,95] verursachte die Gegenwart von Mg^{2+} bei dem Rattenenzym eine Aktivitätssteigerung. Ähnliche Ergebnisse berichteten auch schon Pittman und Steinberg bei Lipase-Bestimmungen im gleichen Homogenat [91]. Für den Prozentsatz der Aktivierung wurden somit meistens zwei Werte angegeben; zum einen wurden die prozentualen Angaben auf die Grundaktivität berechnet, zum anderen auf den Mg^{2+} -Wert.

Für alle nachfolgenden Aktivierungen wurde 100 Ü eingesetzt, der zuvor über eine Sephadex G25 Säule von endogenen Cofaktoren befreit worden war; der Säulenpuffer war, wenn nicht anders angegeben, 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTE, 5 mM Benzamidin (siehe 2.11.1).

3.2.3.1 Abhängigkeit der Aktivierung von der BSA-Substrat-Form

Wie in 3.2.1 erwähnt, war die CEH-Aktivität sehr stark von der vorliegenden Form des BSA-Substrates abhängig, und auch auf die Aktivierbarkeit hatte dies entscheidende Einflüsse.

Tab. 2 zeigt zwei Aktivierungsschemata, bei denen die CEH am gleichen Tag mit BSA-Substrat der gleichen Charge getestet worden war; ein Teil des Substrates war jedoch 10 Tage bei $+4^{\circ}C$ (A), ein anderer bei $-20^{\circ}C$ (B) gelagert worden.

Die absoluten Grundaktivitäten waren bei Substrat B ca. 70% höher als bei A, bei der Aktivierung machte sich diese Aktivitätssteigerung noch drastischer bemerkbar. Nach Zugabe aller Cofaktoren wurde mit Substrat B die 3fache Aktivität als mit dem +4°C gelagerten Substrat erzielt, und dementsprechend unterschiedlich verhielten sich auch die Prozentsätze der Aktivierung (335% bzw. 537% in bezug auf die Grundaktivität).

Testete man das Substrat sofort nach der Präparation, wurden Werte wie bei A erzielt, so daß angenommen werden muß, daß das Cholesterinoleat durch Lagerung bei -20°C in eine für die CEH leichter zugängliche Form überführt wird, wobei der Zugang der phosphorylierten CEH im Vergleich zum dephosphorylierten Enzym zum Substrat begünstigt ist.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde das BSA-Substrat von nun an bei -20°C gelagert.

Tabelle 2 CEH-Aktivität und Aktivierbarkeit in Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur des BSA-Substrats

Zusätze	Substrat A		Substrat B	
	CEH-Aktivität		CEH-Aktivität	
	pMol/min x mg	%	pMol/min x mg	%
-	168	100	281	100
Mg ²⁺	325	193 100	582	207 100
Mg ²⁺ , ATP	371	221 115	850	302 146
Mg ²⁺ , ATP, cAMP	562	335 173	1510	537 260

Substrat A: +4°C gelagert

Substrat B: -20°C gelagert

Die Inkubation erfolgte nach 2.6.1.3 mit 225 µg Protein (150 µl G25-Pool) pro Ansatz. Die Cofaktorkonzentrationen betragen 6 mM Mg²⁺, 1 mM ATP und 1 µM cAMP.

3.2.3.2 Abhängigkeit von den Cofaktorkonzentrationen (Mg^{2+} , ATP, ATP- γ -S, cAMP)

In Abb. 14 sind die Abhängigkeiten der CEH-Aktivität von den Mg^{2+} , ATP- und cAMP-Konzentrationen wiedergegeben. Die im Test konstant gehaltenen Cofaktorkonzentrationen wurden jeweils im optimalen Konzentrationsbereich eingesetzt.

Mg^{2+} muß jedem Aktivierungsansatz zugesetzt werden, da Proteinkinasen nur mit dem Mg^{2+} -ATP-Komplex als Substrat arbeiten können. Das Maximum der CEH-Aktivierung wurde bei einer Mg^{2+} -Konzentration von 5 mM erzielt (Abb. 14A). ATP konnte dem Ansatz zwischen 0,1 und 1 mM zugesetzt werden (Abb. 14B), um optimale Aktivitäten zu erhalten. Konzentrationen über 1 mM wirkten dagegen inhibierend. Die optimale Konzentration bei der cAMP-Zugabe war 1 μ M, auch hierbei wirkten Konzentrationen > 10 μ M hemmend auf die Aktivierbarkeit (Abb. 14C).

Vergleicht man die in der Legende angegebenen spezifischen Aktivitäten der CEH, so wurde ohne Mg^{2+} -Zusatz eine Aktivität von 421 pMol/min x mg erzielt, ein Wert der der Grundaktivität entsprach, da ATP, cAMP allein keine Wirkung auf Proteinkinasen haben sollten. Der Zusatz von 5 mM Mg^{2+} ohne ATP-Zugabe erhöhte die Aktivität auf 671 pMol/min x mg - eine für das Rattensystem spezifische Aktivitätssteigerung durch Mg^{2+} -Zusatz. Inkubierte man die CEH mit Mg^{2+} und ATP, aber ohne cAMP, wurde die spezifische Aktivität nochmals um 361 pMol/min x mg erhöht, so daß bei diesen Zusätzen eine Aktivierung um 53% über dem Mg^{2+} -Wert bzw. 145% über der Grundaktivität erzielt wurde. Diese Aktivierung sollte ausschließlich auf eine oder mehrere cAMP-unabhängige Proteinkinasen zurückzuführen sein, wenn man annimmt, daß im G25-Pool keine in katalytischer Untereinheit dissoziierte cAMP-abhängige Proteinkinase vorlag (siehe Diskussion 5.3).

ATP- γ -S, das an seiner terminalen Phosphatgruppe statt eines Sauerstoffatoms ein Schwefelatom trägt, wird in der Literatur als ein Phosphatdonator beschrieben, der bei der Übertragung seines Phosphatrestes auf Phosphorylase, dieses phosphory-

lierte Enzym gegenüber Phosphorylase-Phosphatase resistent erscheinen läßt [132]. Auch die CEH-Fraktion wurde mit diesem ATP-Analogon inkubiert, die Abhängigkeit dieser Aktivierung von der ATP- γ -S-Konzentration ist in Abb. 15 dargestellt. Der 100%-Wert entsprach dabei der Aktivität, die mit 5 mM Mg^{2+} erzielt wurde.

Ohne Zusatz von cAMP wurde zwischen 0,1 mM und 0,2 mM eine geringfügige Aktivierung (20%) beobachtet, bei Zugabe von cAMP wurde in Gegenwart von 0,5 mM ATP- γ -S die CEH um 110% über dem Mg^{2+} -Wert aktiviert.

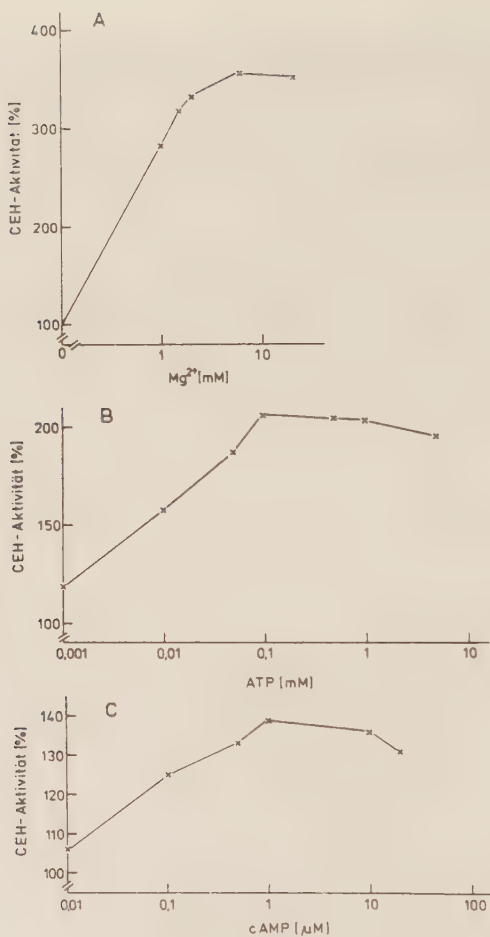


Abb. 14: Abhängigkeit der CEH-Aktivität von der

A Mg^{2+} -Konzentration

B ATP-Konzentration

C cAMP-Konzentration

Legende:

Pro Test wurden 220 μ g Protein (150 μ l G25-Pool) eingesetzt;
100% Aktivität entsprachen dabei

A	421 pMol/min x mg bei	0 mM Mg^{2+}
		1 mM ATP
		1 μ M cAMP
B	671 pMol/min x mg bei	5 mM Mg^{2+}
		0 mM ATP
		1 μ M cAMP
C	1032 pMol/min x mg bei	5 mM Mg^{2+}
		1 mM ATP
		0 μ M cAMP

Zur besseren Aktivierung wurde dem Testansatz 100 mM $K-PO_4$ zugesetzt (siehe 3.2.3.5).

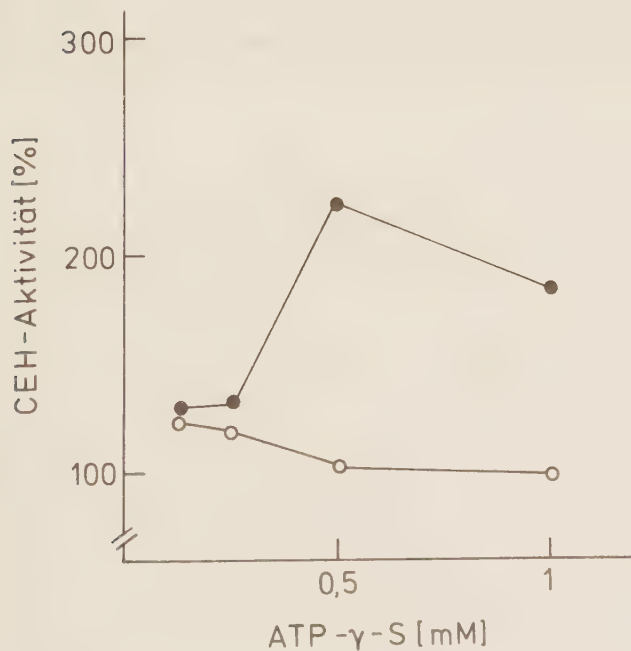


Abb. 15: Abhängigkeit der CEH-Aktivität von der ATP- γ -S-Konzentration

Pro Inkubationsansatz wurden 250 μ g Protein (150 μ l G25-Pool) eingesetzt. Der Mg^{2+} -Wert entsprach einer Aktivität von 81 pMol/min x mg (100%) bei Gegenwart von 100 mM $K-PO_4$ (siehe 3.2.3.5) im Test.

○ — ○ 5 mM Mg^{2+} , ATP- γ -S
 ● — ● 5 mM Mg^{2+} , 1 μ M cAMP, ATP- γ -S

3.2.3.3 Abhängigkeit der Aktivierung von der Proteinkonzentration

Die CEH-Aktivierung war sehr stark von der im Testansatz enthaltenen Proteinkonzentration abhängig. Abb. 16 gibt diese Abhängigkeit sowohl für die Mg^{2+} -, Mg^{2+} ,ATP-(Abb. 16A) als auch Mg^{2+} ,ATP,cAMP-Aktivierung (Abb. 16B) wieder. Bezogen auf die Grundaktivität wurde die höchste Aktivierung bei allen 3 Testreihen bei 50 μg Protein pro Ansatz erzielt, danach nahm die Aktivierung kontinuierlich ab und blieb ab einer Proteinmenge von 300 μg pro Test konstant. Berechnete man allerdings die Mg^{2+} ,ATP,cAMP-Aktivierung auf den Mg^{2+} -Wert, wurde die beste Stimulierung bei 175 μg Protein beobachtet (16B), weniger oder mehr Protein im Testansatz störte die Aktivierungsrate.

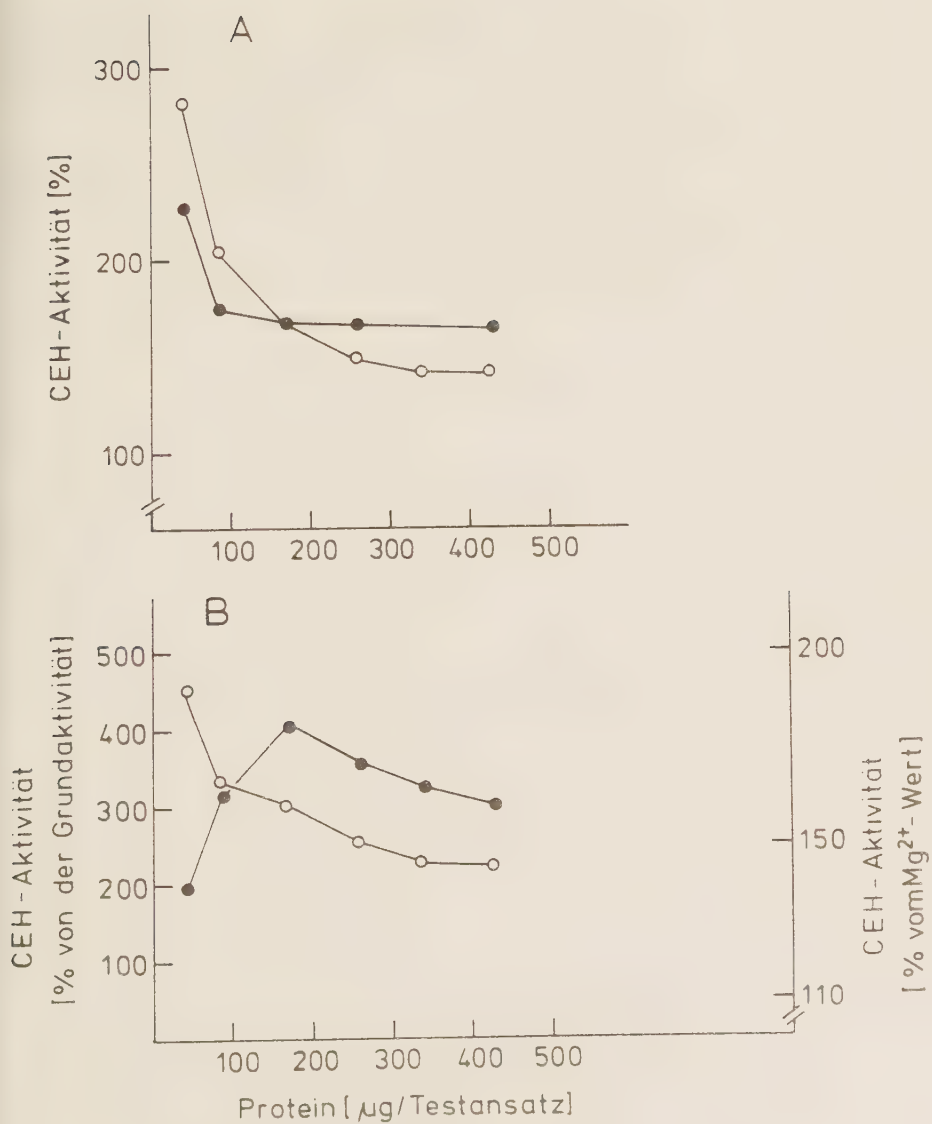


Abb. 16

Abb. 16: Abhängigkeit der Aktivierbarkeit vom Proteingehalt im Testansatz

A: Aktivierbarkeit, durch Mg^{2+} (o — o) bzw. Mg^{2+} , ATP (● — ●) berechnet auf den für die jeweils eingesetzte Proteinkonzentration bestimmten Grundwert

B: Aktivierbarkeit, durch Mg^{2+} , ATP, cAMP berechnet auf den für die jeweils eingesetzte Proteinkonzentration bestimmten Grund- (o — o) bzw. Mg^{2+} -Wert (● — ●)

Die Cofaktorkonzentrationen betrugen 5 mM Mg^{2+} , 1 mM ATP und 1 μ M cAMP.

3.2.3.4 Kinetik der Aktivierung mit ATP und ATP- γ -S

Das Ausgangsmaterial aller Aktivierungsstudien war 100 U, ein Rohextrakt, in dem neben der CEH alle Proteinkinasen und -phosphatasen enthalten waren. In diesem Versuch sollte deshalb der Zeitpunkt ermittelt werden, bei dem maximale CEH-Aktivierung stattfand, d.h. bei dem die Kinase-Aktivitäten im Vergleich zu denen der Phosphatasen relativ überwogen.

In Abb. 17 ist solch eine Aktivierungskinetik dargestellt. Abb. 17A zeigt die spezifischen Aktivitäten der CEH in Abhängigkeit von der Zeit bei Zusatz der verschiedenen Cofaktoren. In Abb. 17B ist diese Aktivierung prozentual in bezug auf den Mg^{2+} -Wert aufgetragen.

Neben einem sehr ausgeprägten Mg^{2+} -Effekt fiel auf, daß alle Aktivierungen mit ATP- γ -S geringere Stimulierungsraten aufwiesen als die entsprechenden ATP-Ansätze. Abb. 17B zeigt deutlich, daß schon nach 20 min das Maximum der Aktivierung mit Mg^{2+} , ATP, cAMP erreicht war, dieser Wert blieb bis 30 min konstant und nahm dann wieder ab.

Bei den gleichen Aktivierungsstudien mit ATP- γ -S wurde, wie in der Literatur beschrieben [115], eine langsamere Kinetik beobachtet; im Gegensatz zu den Literaturdaten [115,132] blieb dieser Aktivierungszustand aber nicht konstant, sondern verminderte sich wie bei allen anderen Ansätzen nach 30 min.

Die Mg^{2+} , ATP- und Mg^{2+} , ATP- γ -S-Aktivierungen zeigten nahezu die gleiche Kinetik mit einer maximalen CEH-Aktivität bei 30 min 37°C Inkubation.

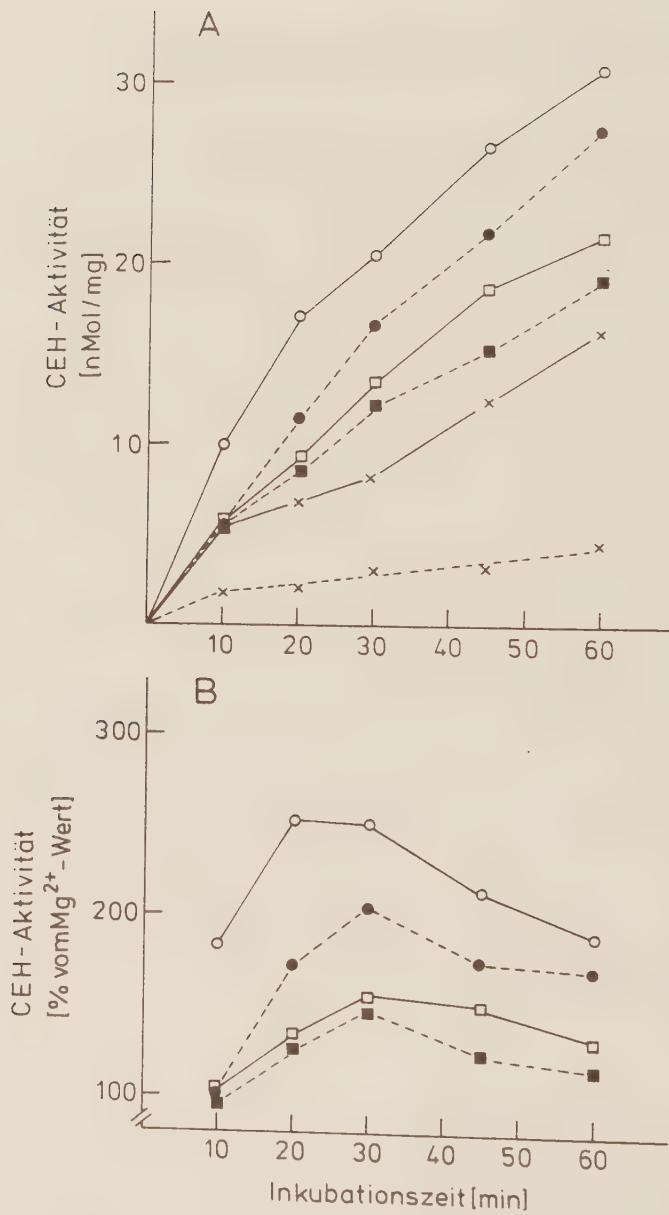


Abb. 17

Abb. 17: Aktivierungskinetik der CEH

A: Zeitabhängigkeit der CEH-Aktivität bei Zusatz von

-	x --- x
Mg ²⁺	x — x
Mg ²⁺ , ATP	□ — □
Mg ²⁺ , ATP-γ-S	■ --- ■
Mg ²⁺ , ATP, cAMP	○ — ○
Mg ²⁺ , ATP-γ-S, cAMP	● --- ●

B: Kinetik der Aktivierung, berechnet auf den für
die jeweilige Zeit bestimmten Mg²⁺-Wert (100%)

Mg ²⁺ , ATP	□ — □
Mg ²⁺ , ATP-γ-S	■ --- ■
Mg ²⁺ , ATP, cAMP	○ — ○
Mg ²⁺ , ATP-γ-S, cAMP	● --- ●

Pro Inkubationsansatz wurden 200 µg Protein (200 µl G25-Pool) eingesetzt. Die Cofaktorkonzentrationen betrugen 5 mM Mg²⁺, 1 mM ATP, 0,5 mM ATP-γ-S und 10 µM cAMP.

3.2.3.5 Einfluß von Phosphataseinhibitoren auf die Aktivierung

Um eine möglichst effektive Aktivierung zu erzielen, wurden in diesem Versuch verschiedene Phosphataseinhibitoren dem Testansatz zugesetzt.

Die Wirkung von 100 mM K-PO₄, 10 mM GSSG, 100 mM NaF und 100 mM NaMoO₄ auf die CEH-Aktivierung ist in Tab. 3 wiedergegeben. Der Inkubationspuffer war, wie in 2.11.1 beschrieben, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4.

Bei allen Zusätzen wurde die Grundaktivität der CEH erniedrigt, dies war z.T. auf eine Inhibierung der CEH selbst (z.B. NaF) oder auf eine Beeinflussung der BSA-Substrat Form wie beim K-PO₄-Zusatz zurückzuführen. Berechnete man ausgehend von diesen Grundaktivitäten oder vom erhaltenen Mg²⁺-Wert die Aktivierung nach Zugabe von Mg²⁺, ATP, cAMP, so war bei allen Ansätzen mit Inhibitor ein höherer Aktivierungsgrad zu beobachten.

Schlußfolgerung aus diesem Versuch war, daß von nun an allen Aktivierungsansätzen 100 mM K-PO₄ zugesetzt wurde, um eine möglichst effektive Aktivierung zu erzielen.

Überführte man 100 Ü sofort auf einer Sephadex G25-Säule in 100 mM K-PO₄-Puffer, erzielte man zwar den gleichen Effekt, allerdings mit dem Nachteil, daß die absoluten CEH-Aktivitäten nochmals um ca. 50% erniedrigt waren.

Tabelle 3 Einfluß von Phosphataseinhibitoren auf die Aktivierung

Zusätze	-		100 mM K-PO ₄		100 mM GSSG		100 mM NaF		100 mM NaMoO ₄	
	CEH-Aktivität pMol/min x mg	%	CEH-Aktivität pMol/min x mg	%	CEH-Aktivität pMol/min x mg	%	CEH-Aktivität pMol/min x mg	%	CEH-Aktivität pMol/min x mg	%
-	175	100	116	100	125	100	43	100	122	100
Mg ²⁺	219	125	193	166	192	154	39	91	126	103
Mg ²⁺ , ATP	255	145	284	244	178	142	41	95	180	148
Mg ²⁺ , ATP, cAMP	358	205	455	392	321	257	71	165	350	287

Pro Testansatz waren 250 µg Protein (120 µl G25-Pool) enthalten. Die Cofaktoren wurden in den Konzentrationen Mg : 5 mM, ATP : 1 mM und cAMP : 10 µM zugesetzt.

3.2.3.6 Einfluß von Proteinkinase-Inhibitor auf die Aktivierung

Zur Überprüfung, ob die Aktivierung durch Mg^{2+} , ATP, cAMP tatsächlich auf eine cAMP-abhängige Proteinkinase zurückzuführen ist, wurde der spezifische Inhibitor dieses Enzyms eingesetzt. Das Ergebnis dieser Aktivierungsstudien gibt die Tab. 4 wieder

Proteinkinase-Inhibitor-1 war käuflich erworben, Proteinkinase-Inhibitor-2 war nach Walsh et al. [133] von Herrn Dr. U. Sonnenborn präpariert worden. Beide Inhibitoren stammten aus dem Kaninchenmuskel. Die verminderten absoluten CEH-Aktivitäten in Gegenwart von PKI-2 könnten auf Faktoren in der Eigenpräparation zurückzuführen sein, die den empfindlichen BSA-Test störten. Das Ziel des Versuches wurde jedoch mit beiden Inhibitoren erreicht. Die Aktivitätssteigerung von 141% (Mg^{2+} , ATP) auf 217% bei cAMP-Zusatz wurde in Gegenwart von Proteinkinase-Inhibitor auf 19% bzw. 6% über dem Mg^{2+} , ATP-Wert gesenkt, so daß für diese Aktivierung, übereinstimmend mit den Aussagen von Beckett und Boyd [95], eine cAMP-abhängige Proteinkinase verantwortlich zu sein scheint.

Die Mg^{2+} , ATP-Aktivierung war durch PKI-1 nicht beeinflussbar, die fehlende Stimulierung durch Mg^{2+} , ATP in Gegenwart von PKI-2 könnte durch inhibierende Verunreinigungen in der Eigenpräparation erklärbar sein.

Tabelle 4 Aktivierung in Gegenwart von Proteinkinase-Inhibitor (PKI)

Zusätze	-		PKI-1		PKI-2	
	CEH-Aktivität		CEH-Aktivität		CEH-Aktivität	
	pMol/min x mg	%	pMol/min x mg	%	pMol/min x mg	%
-	345	100	338	100	183	100
Mg ²⁺	431	125	400	118	287	157
Mg ²⁺ , ATP	487	141	507	150	276	151
Mg ²⁺ , ATP, cAMP	748	217	529	156	312	170

Von PKI-1 wurden 100 µg, von PKI-2 1000 µg pro Test eingesetzt. Die zugegebene Menge an G25-Pool (100 µl) entsprach 170 µg Protein, und die Cofaktorkonzentrationen betrugen 2 mM Mg²⁺, 1 mM ATP und 1 µM cAMP.

3.2.3.7 Rekombinationsversuche zur Aktivierung nach Abtrennung der katalytischen Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase

9 ml G25-Pool (15 mg Protein) wurden 1h bei 4°C mit 1 mM cAMP inkubiert, um das Holoenzym der cAMP-abhängigen Proteinkinase zu dissoziieren. Nach Abnahme der Proben für die CEH-Bestimmung wurden die restlichen 6,7 ml in 0,5 ml Phosphocellulose P-11 (in 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTE, 5 mM Benzamidin äquilibriert) eingerührt. Nach 30 min Inkubation bei 4°C wurde die Enzymlösung über eine Nutsche vom P-11 Material abgetrennt (P-11-Durchlauf: 6,7 ml, 0,9 mg Protein/ml), das Gel wurde dann in 6,7 ml 50 mM Tris-Puffer (s.o.), der 0,5 M NaCl enthielt, aufgenommen und erneut abgenutscht. Das P-11-Eluat (6,7 ml, 0,64 mg Protein/ml), in dem sich die katalytische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase befand, wurde wegen des sehr hohen Salzgehaltes gegen 50 mM Tris-HCl-Puffer (s.o.) dialysiert und anschließend mit PEG auf 1,2 ml konzentriert.

Tab. 5 gibt die Aktivierungsschemata der CEH vor und nach dem P-11-Batch-Verfahren wieder, außerdem ist die Aktivierungsrate des P-11-Durchlaufs nach Zugabe von endogener und exogener katalytischer Untereinheit angegeben.

Die Ergebnisse der Versuchsreihe A zeigen, daß die CEH im G25-Pool durch Mg^{2+} , ATP, cAMP um 40% gegenüber dem Mg^{2+} -Wert aktivierbar war, nach Abtrennung der katalytischen Untereinheit konnte dagegen keine Aktivierung im P-11-Durchlauf erzielt werden. Das P-11-Eluat besaß wider Erwarten noch eine so hohe CEH-Aktivität, daß die Rekombinationsversuche mit diesem Eluat in bezug auf die Aktivierungsrate keine Aussagen machten. Erst durch Zugabe von Esterase-freier exogener katalytischer Untereinheit (isoliert von Herrn Dr. M. Hiep aus der Nebennierenrinde des Rindes) zum P-11-Durchlauf konnte die echte Aktivierungsrate (26%) durch Rekombination ermittelt werden.

Im Vergleich zu vielen anderen Versuchen waren die in A ermittelten Stimulierungsfaktoren sehr niedrig. In einem zwei-

ten Versuch (B) wurde deshalb dem Testansatz 100 mM K-PO₄ zugesetzt und ein BSA-Substrat verwendet, das sehr gute Aktivierungsraten erzielte. In diesem Fall stieg die Aktivität des 100 Ü nach Zugabe aller Cofaktoren auf 442% im Vergleich zum Mg²⁺-Wert an, nach Abtrennung der katalytischen Untereinheit wurde nur noch eine Aktivitätssteigerung von 18% erzielt, und die Zugabe der exogenen katalytischen Untereinheit führte im Rekombinationsversuch wieder zu einer Aktivierung um 187%. Die Messungen im P-11-Eluat und der Rekombinationsversuch mit diesem Eluat wurden wegen der relativ hohen CEH-Aktivität nicht durchgeführt. Parallel zu diesen Esterase-messungen wurde auch der [³²P]Phosphat-Einbau in die CEH-Bande (MG:84 kDa) vor und nach Chromatographie an Phosphocellulose P-11 verfolgt (siehe 3.2.7.3).

Tabelle 5 CEH-Aktivierung vor und nach Abtrennung der katalytischen Untereinheit - Rekombinationsversuche

Zusätze	1 G 25		2 P-11-Durchlauf		3 P-11-Eluat		4 P-11-Durchlauf + P-11-Eluat		5 P-11-Durchlauf + exogene katalyt. Untereinheit	
	CEH-Aktivität pMol/min x mg	%	CEH-Aktivität pMol/min x mg	%	CEH-Aktivität pMol/min x mg	%	CEH-Aktivität pMol/min x mg	%	CEH-Aktivität pMol/min x mg	%
A										
	CAMP	210	100	617	100	86	100	129	715	100
	Mg ²⁺ , CAMP	325	156 100	701	114 100	105	123 100	121	869	122 100
	Mg ²⁺ , ATP, cAMP	445	213 137	699	113 100	166	194 157	206	1096	153 126
B										
	cAMP	47	100	15	100				32	100
	Mg ²⁺ , cAMP	88	187 100	34	227 100				53	166 100
	Mg ²⁺ , ATP, cAMP	389	828 442	40	267 118				152	475 287

Der Testansatz enthielt

- 1) 100 µl G25-Pool (150 µg Protein)
- 2) 100 µl P-11-Durchlauf (90 µg Protein)
- 3) 60 µl P-11-Eluat (180 µg Protein)
- 4) 100 µl P-11-Durchlauf (90 µg Protein) + 60 µl P-11-Eluat (180 µg Protein)
- 5) 100 µl P-11-Durchlauf (90 µg Protein) + 0,1 U kat. Untereinheit (10 µl, 2,3 µg Protein)

Die Cofaktorkonzentrationen betragen 5 mM Mg²⁺, 1 mM ATP und 10 µM cAMP, bei Versuchsreihe B wurde dem Ansatz 100 mM K-PO₄ zugesetzt.

3.2.4 Gelchromatographie eines 100 Ü an Sepharose CL-6B

Zur Abtrennung der mit pNPP meßbaren Phosphatase-Aktivität von der CEH wurden 2 ml 100 Ü (10 mg Protein) auf einer Sepharose CL-6B Säule (105 cm x 1,40 cm) chromatographiert. Die Äquilibration der Säule und die Elution der Proteine erfolgte in 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTE, 1 mM Benzamidin (siehe 2.11.2).

Die Aktivitätsprofile der CEH und der Proteinphosphatase sind in Abb. 18 wiedergegeben. Wie bei der Sephacryl S-300 Säule (siehe 3.2.2) ergaben sich 2 Esterase- und auch 2 mit pNPP bestimmbare Phosphatasepeaks.

Ca. 50% der CEH-Aktivität eluierte im Ausschlußvolumen V_0 .

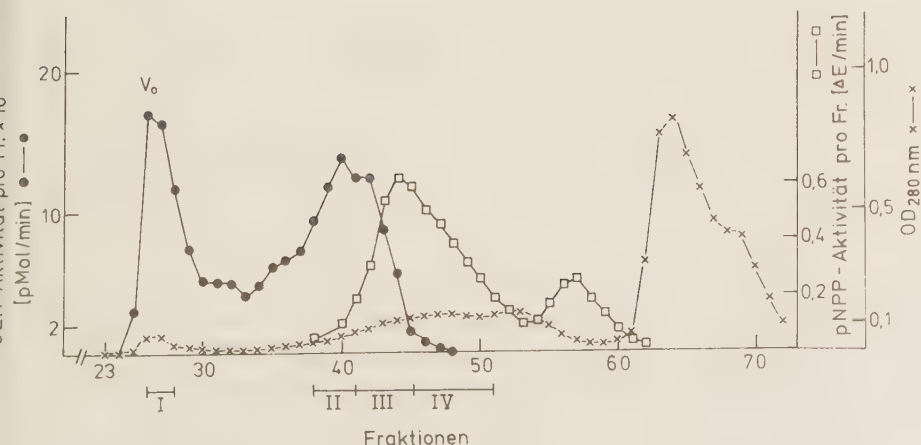


Abb. 18: Gelfiltration eines 100 Ü an Sepharose CL-6B

Peak II der Esterase (MG: 300-500 kDa) war wegen der besseren Auftrennung dieser Säule gegenüber der Sephacryl S-300 Säule nur noch im zweiten Teil des Peaks durch Phosphataseaktivität verunreinigt.

Bei einem Stabilitätstest des Esteraseprofils wurde festgestellt, daß die Fraktionen auch nach 5 Tagen Aufbewahrung bei 4°C keinen Aktivitätsverlust aufwiesen.

Es wurden die Fraktionen 26-28, 38-41, 42-45 und 46-51 vereinigt und als Ausgangsmaterial für Aktivierungs- und Inaktivierungsstudien der CEH verwendet (siehe unten). Außerdem wurde die gleiche Gelchromatographie wiederholt, wobei als Säulenpuffer 100 mM K-PO₄ pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTE, 1 mM Benzamidin verwendet wurde.

Abgesehen von absolut geringeren CEH-Aktivitäten (siehe 3.2.3.5)) wurde das gleiche Ergebnis erzielt, und auch diese Fraktionen dienten als Ausgangsmaterial für den nächsten Versuch (siehe oben).

Inaktivierung der CEH durch Zugabe des Phosphatasepools der Säule

Tab. 6 gibt die Aktivitäten der verschiedenen CEH-Fraktionen einer Tris- und K-PO₄-Säule (siehe unten) (I: Fr. 26-28, II: Fr. 38-41, III: Fr. 42-45) in Gegenwart bzw. Abwesenheit des Phosphatasepools (IV: Fr. 46-51) wieder.

Pool I zeigte im Gegensatz zu den beiden anderen CEH-Fraktionen keine Aktivierbarkeit, da im v₀-Bereich, wenn man die Ergebnisse aus dem Rindersystem zugrunde legt, nur sehr geringe Proteinkinaseaktivitäten eluieren. [Nicht gezeigte Daten, Sonnenborn und Kunau]

Die Grundaktivitäten der 3 verschiedenen CEH-Pools ließen sich durch Zugabe der Phosphatasefraktion während der 30 min Testzeit drastisch vermindern. Bei der in Tris-Puffer eluierten Säule wurden die Aktivitäten auf 33%, 19% und 21% für die jeweiligen Pools I, II und III gesenkt, der gleiche Versuch bei einem Säulenlauf in 100 mM K-PO₄-Puffer zeigte dagegen nur eine Verminderung der Aktivitäten auf 45%, 75% und 68%.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Inaktivierung der CEH auf eine Dephosphorylierung zurückzuführen sein könnte. Auch der folgende Versuch sprach für diese Annahme: Phosphorylierte man die CEH-Fraktionen mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ und verfolgte den $[\text{}^{32}\text{P}]\text{Phosphatausbau}$ in Gegenwart bzw. Abwesenheit von Pool IV, konnte ein signifikant höherer Ausbau in Gegenwart der Phosphatasefraktion festgestellt werden (nicht gezeigte Daten).

Widersprüchlich zu diesen Ergebnissen war jedoch, daß Phosphatasehemmer wie z.B. GSSG oder NaVO_3 keinen Einfluß auf die Aktivitätsverminderung hatten, auch wurde in Gegenwart von Pool IV die prozentuale Aktivierungsrate bei Zugabe von Mg^{2+} , ATP, cAMP nicht beeinflußt.

Proteasen, die eventuell auch für diese Inaktivierungsreaktion verantwortlich sein konnten, wurden im Phosphatasepool nicht nachgewiesen.

Tabelle 6 Aktivierbarkeit und Inaktivierung der CEH nach Gelfiltration an Sepharose CL-6B

Pool	Zusätze	50 mM Tris HCl pH 7,4		100 mM K-PO ₄ pH 7,4	
		CEH-Aktivität		CEH-Aktivität	
		pMol/min x mg	%	pMol/min x mg	%
I	Mg ²⁺	479	100	194	100
	Mg ²⁺	680	142	298	154
	Mg ²⁺ , ATP	624	130	250	129
	Mg ²⁺ , ATP, cAMP	644	134	247	127
II	Mg ²⁺	426	100	101	100
	Mg ²⁺	622	146	122	121
	Mg ²⁺ , ATP	658	154	179	177
	Mg ²⁺ , ATP, cAMP	805	189	238	236
III	Mg ²⁺	256	100	68	100
	Mg ²⁺	757	296	122	179
	Mg ²⁺ , ATP	772	302	122	179
	Mg ²⁺ , ATP, cAMP	1146	448	151	122
I		454	100	194	100
I + IV		148	33	87	45
II		438	100	101	100
II + IV		83	19	76	75
III		256	100	68	100
III + IV		55	21	46	68

Für die Aktivierungsversuche wurden jeweils 200 µl pro Pool eingesetzt, die Inaktivierungsmessungen wurden mit je 125 µl Pool I-III und 125 µl Pool IV durchgeführt. Die Cofaktorkonzentrationen betragen 5 mM Mg²⁺, 1 mM ATP und 1 µM cAMP.

3.2.5 Inhibierung der CEH-Aktivität durch TFP

Wie die Abb. 19 zeigt, übt TFP nicht nur einen inhibierenden Effekt auf Ca^{2+} /Calmodulin-[131] und Ca^{2+} /Phospholipid-[130] abhängige Proteinkinasen aus, sondern auch auf die CEH. In der Abbildung ist die Abhängigkeit der Enzymaktivität im 100 Ü bei Zusatz von 10^{-7} bis 10^{-3} M TFP im Testansatz dargestellt.

Halbmaximale Hemmung wurde bei einer Inhibitorkonzentration von $1,5 \times 10^{-5}$ M beobachtet, eine Konzentration, die um $2,5 \times 10^{-5}$ M niedriger lag als die halbmaximale Hemmkonzentration bei der TFP inhibierten Steroidogenese suspendierter Nebennierenzellen der Ratte (siehe 3.1.5).

Hemmkurven von einem G25-Pool mit und ohne Zugabe von den für die Aktivierung notwendigen Cofaktoren zeigten den gleichen Verlauf.

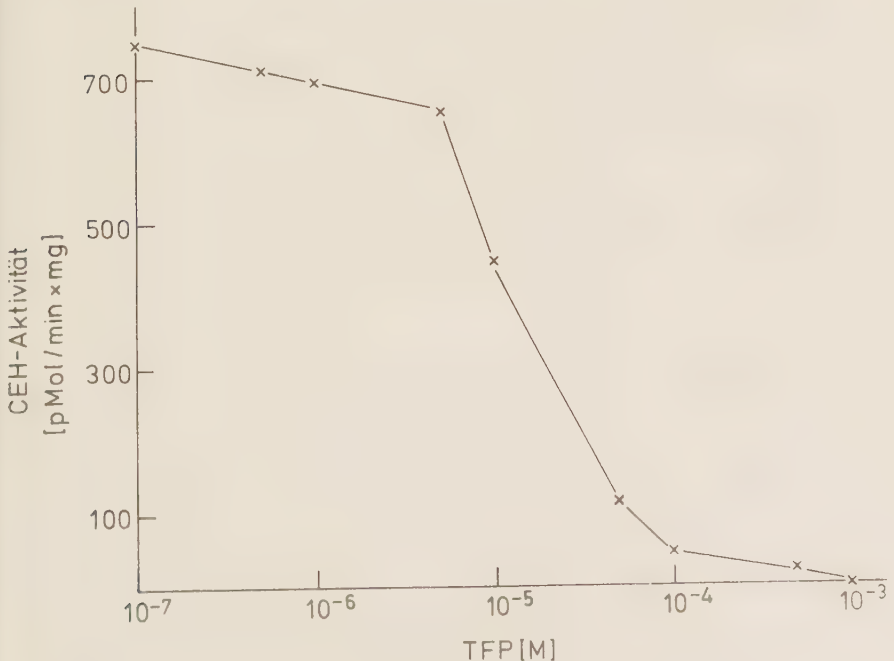


Abb. 19: Abhängigkeit der CEH-Aktivität im 100 Ü von der TFP-Konzentration im Testansatz

3.2.6 Präparative Herstellung einer stabilen aktivierten CEH-Form

Bei allen bisher beschriebenen Versuchen wurde eine CEH-Aktivierung nur in Gegenwart der Cofaktoren während des CEH-Testes beobachtet. Ziel dieses Versuches war es, eine Enzymfraktion zu aktivieren, anschließend die Cofaktoren abzutrennen und nach dieser Abtrennung eine CEH-Form vorliegen zu haben, die eine erhöhte Aktivität zeigte.

Der Versuchsablauf ist in Abb. 20 wiedergegeben:

Je 5 ml G25-Pool (15 mg Protein) wurden 10 min bei 37°C in Puffer A in Gegenwart von 2 mM Mg^{2+} (I) bzw. 2 mM Mg^{2+} , 1 mM ATP und 10 μ M cAMP (II) inkubiert. Nach Beendigung dieser Inkubationszeit wurden sofort Aliquots (250 μ l) für einen 10 min CEH-Test abgenommen. Die restlichen 4 ml wurden mittels einer mit Sephadex G50 gefüllten Spritze (siehe 2.12) von den Cofaktoren befreit. Bei Versuch 1 war das G50-Material in einem Tris/ $K-PO_4$ -Puffer (Puffer A), bei Versuch 2 nur in einem Tris-Puffer (Puffer B) äquilibriert. Sofort nach Abtrennung der Cofaktoren wurde wiederum ein CEH-Test (10 min) durchgeführt, die restlichen 3 ml des G50-Pools wurden ohne BSA-Substrat weitere 50 min bei 37°C inkubiert und anschließend von je 250 μ l 10 min die CEH-Aktivität bestimmt. Neben der Grundaktivität wurden in diesem Fall auch die Aktivierungsraten ermittelt. Auch bei den Ansätzen in Puffer B wurde zur besseren Aktivierung nun 100 mM $K-PO_4$ zugesetzt.

Um die Phosphatasewirkung auf die CEH möglichst gering zu halten, beruhen alle Enzymbestimmungen auf nur einen 10 minütigen Test.

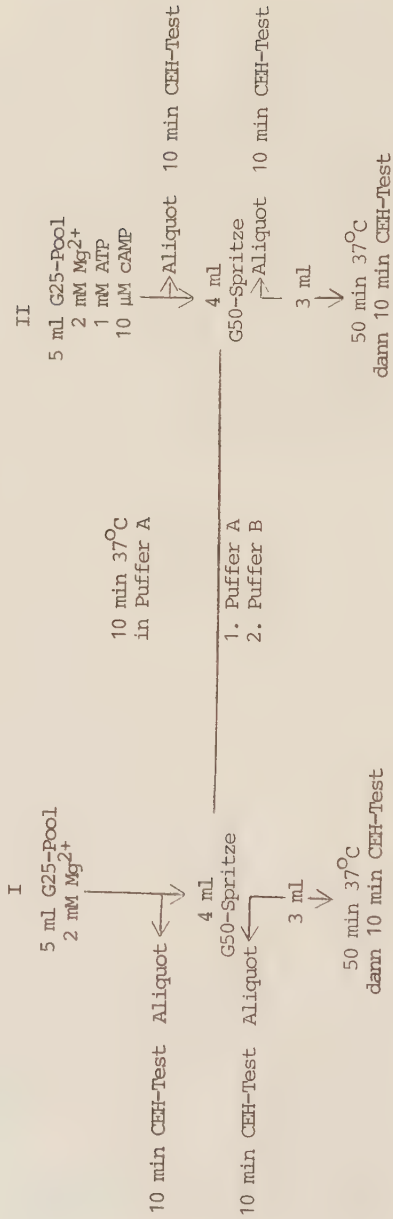
Das Ergebnis dieses Versuchs gibt die Tab. 7 wieder. Der G25-Pool wurde in Gegenwart aller Cofaktoren im Versuch 1 auf 322% Aktivität im Vergleich zur Kontrolle (100%), im Versuch 2 auf 209% aktiviert. Nach Abtrennung der Cofaktoren mittels einer G50-Spritze, die in 50 mM Tris-HCl/100 mM $K-PO_4$ pH 7,4 äquilibriert war, blieb diese Aktivierung erhalten (217%), wohingegen nach Überführung der Enzymfraktion in 50 mM Tris-HCl pH 7,4 kein Aktivitätsunterschied zwischen I und II zu beobachten war.

Nach weiteren 50 min Inkubation bei 37°C und anschließendem CEH-Test war die Aktivität des zuvor aktivierten Enzyms in Tris/K-PO₄-Puffer immer noch um 83% höher als die nur mit Mg²⁺ inkubierte CEH. Eine erneute Aktivierung wurde nur in diesem Mg²⁺-Ansatz erzielt, die schon aktivierte CEH wurde durch Cofaktorzugabe nicht weiter in ihrer Aktivität erhöht.

Das in Tris-Puffer vorliegende Enzym (Versuch 2) war auch im Ansatz II so inaktiviert worden, daß eine erneute Stimulierung der Enzymaktivität durch Mg²⁺, ATP, cAMP möglich war.

Dieser Versuch zeigt zum erstenmal das Vorliegen einer aktivierten CEH-Form ohne Cofaktorgegenwart und die reversible Aktivierung des Enzyms, wie sie für die Hormon-sensitive Lipase des Hühnchenfettgewebes beschrieben wird [134,135].

Abb. 20: Versuchsablauf: Reversible Aktivierung / Inaktivierung der CEH



Puffer A: 50 mM Tris-HCl pH 7,4
100 mM K- PO_4
1 mM EDTA
1 mM EGTA
1 mM DTE
5 mM Benzamidin

Puffer B: Puffer A ohne 100 mM K- PO_4

Tabelle 7 CEH-Aktivität vor und nach Abtrennung der Cofaktoren - Vergleich von Puffersystemen

	1.		2.	
	CEH-Aktivität pMol/min x mg	%	CEH-Aktivität pMol/min x mg	%
<u>vor G50</u>	Puffer A		Puffer A	
I	35	100	122	100
II	111	322	255	209
<u>nach G50</u>	Puffer A		Puffer B	
10 min I	18	100	223	100
II	39	217	224	100
60 min I				
-	43	100 100	249	100 100
Mg ²⁺	55	128	289	116
Mg ²⁺ , ATP, cAMP	94	218	416	167
II				
-	79	100 183	254	100 85
Mg ²⁺	99	125	282	111
Mg ²⁺ , ATP, cAMP	95	120	349	138

Die unterschiedlichen absoluten Aktivitäten bei Versuch 1 und 2 sind auf verschiedene BSA-Substrat-Chargen zurückzuführen.

3.2.7 In vitro-Phosphorylierung der CEH

Neben der in vitro-Aktivierung der CEH durch Mg,ATP,cAMP sollte die in vitro-Phosphorylierung der 84 kDa-Bande auf dem SDS-Gel durch $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ einen weiteren Hinweis dafür geben, daß auch in vivo das Enzym durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung reguliert sein könnte.

Abb. 21 zeigt das Densitogramm einer Autoradiographie von einem G25-Pool nach Phosphorylierung mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ in Gegenwart bzw. Abwesenheit von cAMP.

In Abb. 22 ist die gleiche Phosphorylierung dargestellt, jedoch wurde statt $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ das Analogon $[\gamma\text{-}^{35}\text{S}]\text{ATP}$ verwendet.

Die Phosphorylierungsansätze enthielten 200 μl G25-Pool (300 μg Protein) mit 5 mM Mg^{2+} in Gegenwart bzw. Abwesenheit von 10 μM cAMP. Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe von 7 μl $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (16 μCi , 0,4 mM im Test) bzw. 2 μl $[\gamma\text{-}^{35}\text{S}]\text{ATP}$ (16 μCi , 0,5 mM im Test), nach 10 min 37°C wurden je 50 μl aus den Reaktionsansätzen entnommen und mit je 50 μl SDS-Probenpuffer versetzt. Nach Denaturierung (15 min 60°C) wurden die Proben auf ein SDS-Gel aufgetragen. Neben Markerproteinen (Phos b: 97 kDa, Transferrin: 80 kDa, BSA: 68 kDa, Glutamatdehydrogenase 53 kDa, Fumarase: 49 kDa) wurde auch eine $[\text{}^3\text{H}]\text{DFP}$ markierte Fraktion der Sephacryl S-300 Säule (siehe 3.2.2) zur Identifizierung der CEH-Bande aufgetragen.

Beide Versuchsansätze zeigten einen stark erhöhten ^{32}p - (Abb. 21) bzw. ^{35}S -Einbau (Abb. 22) nach Zugabe von cAMP in die 84 kDa-Bande.

Die Einbauraten bei den $[\gamma\text{-}^{35}\text{S}]\text{ATP}$ Ansätzen waren meistens jedoch so niedrig, daß keine Auswertung der Fluorographien erfolgen konnte und auf weitere Versuche mit diesem ATP-Analogon verzichtet wurde.

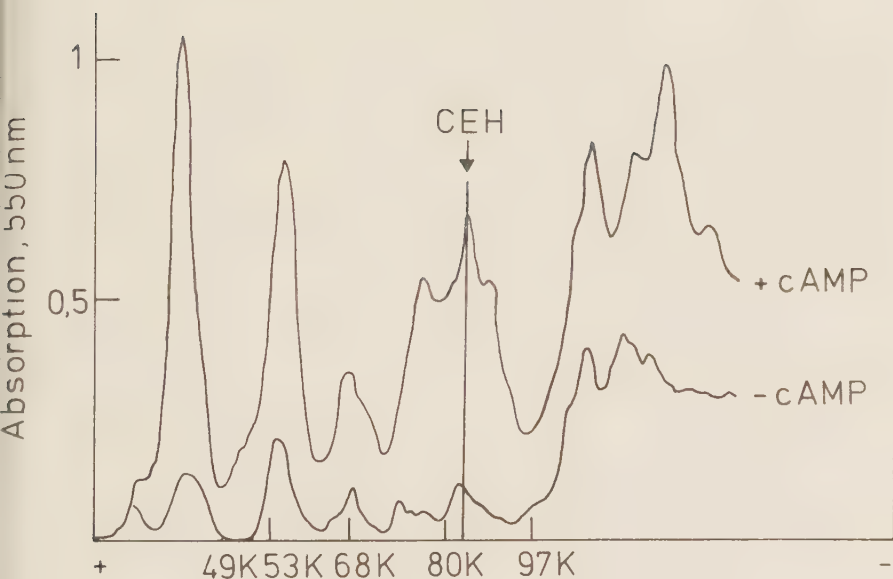


Abb. 21: Densitogramm einer Autoradiographie einer 10%igen SDS-PAGE vom 100 μ

Die Phosphorylierung der CEH-Fraktion erfolgte mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ in Gegenwart bzw. Abwesenheit von cAMP

+ cAMP: 100 μl G25-Pool (75 μg Protein, 15 000 cpm)

- cAMP: 100 μl G25-Pool (75 μg Protein, 11 000 cpm)

Die Position der Markerproteine (siehe Text) und der CEH sind durch Striche markiert.

Die Auswertung der Autoradiographie erfolgte nach der Methode A (siehe 2.15).

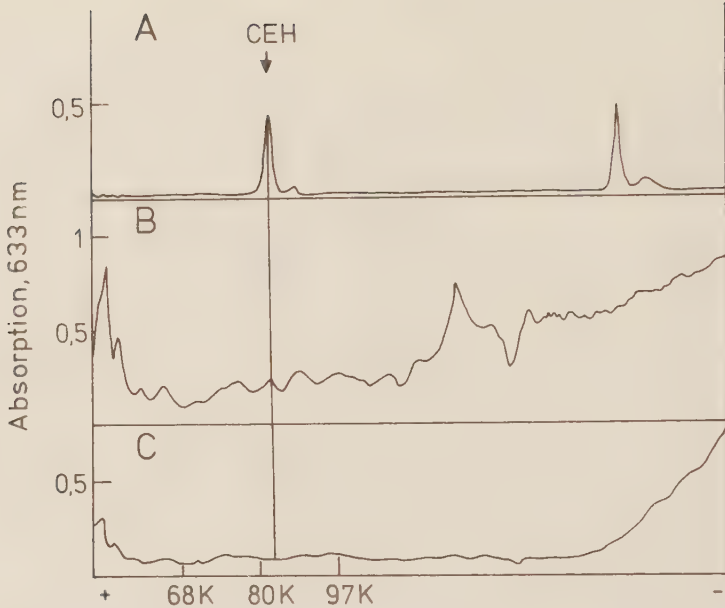


Abb. 22: Densitogramm einer Fluorographie einer
7,5%igen SDS-PAGE vom 100 Ü

Die Phosphorylierung der CEH-Fraktion erfolgte mit
[γ - 35 S]ATP in Gegenwart bzw. Abwesenheit von cAMP.

A [3 H]DFP-Markierung der Sephacryl S-300 Fraktionen 34-37
(siehe 3.2.2.)

100 μ l : 52 μ g Protein, 2900 cpm

B +cAMP : 100 μ l G25-Pool (75 μ g Protein)

C -cAMP : 100 μ l G25-Pool (75 μ g Protein)

Aufgrund methodischer Schwierigkeiten konnten mit dem "Plätt-
chentest" (siehe 2.6.3) keine 35 S-Einbauraten in die Enzym-
fraktionen ermittelt werden.

Die Position der Markerproteine (siehe Text) und der CEH sind
durch Striche markiert.

Die Auswertung der Fluorographie erfolgte nach der Methode C
(siehe 2.15).

3.2.7.1 Phosphorylierungskinetik

Um die Aktivierungskinetik der CEH (siehe 3.2.3.4) mit dem [^{32}P]Phosphateinbau in die 84 kDa-Bande korrelieren zu können, wurden 2 ml G25-Pool (3 mg Protein) mit 5 mM Mg^{2+} in Gegenwart bzw. Abwesenheit von 10 μM cAMP mit je 40 μl [γ - ^{32}P]ATP (93 μCi , 0,4 mM im Testansatz) bis zu 1h bei 37°C inkubiert.

Nach den in Abb. 23 angegebenen Zeiten wurden je 50 μl aus dem Reaktionsansatz entnommen und, wie in 2.6.3 beschrieben, die endogene Phosphorylierung bestimmt. Abb. 24 zeigt die entsprechenden Densitogramme der Autoradiographie vom cAMP-Ansatz.

Übereinstimmend mit der Aktivierungskinetik (siehe 3.2.3.4) wurde der höchste [^{32}P]Phosphateinbau in Gegenwart von cAMP nach 20-30 min Inkubation festgestellt. Im Gegensatz zu den ohne cAMP versetzten Ansätzen nahm der Phosphorylierungsgrad danach wieder ab (Abb. 23).

Eine genaue Untersuchung der phosphorylierten Banden zeigt, daß speziell das CEH-Polypeptid bei der cAMP-abhängigen Phosphorylierung noch 30 min maximal phosphoryliert ist (Abb. 24).

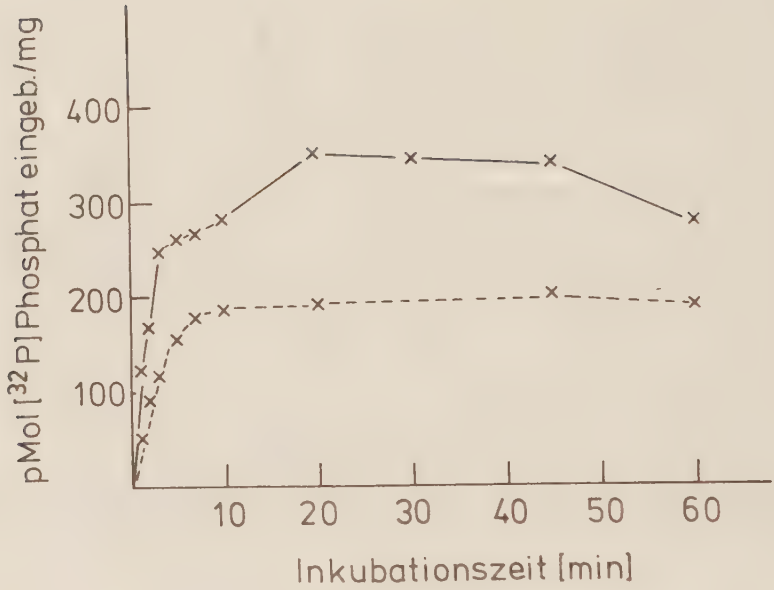


Abb. 23: Zeitverlauf der endogenen Phosphorylierung vom 100 U

x — x: mit Zusatz von 10 µM cAMP

x --- x: ohne Zusatz von 10 µM cAMP

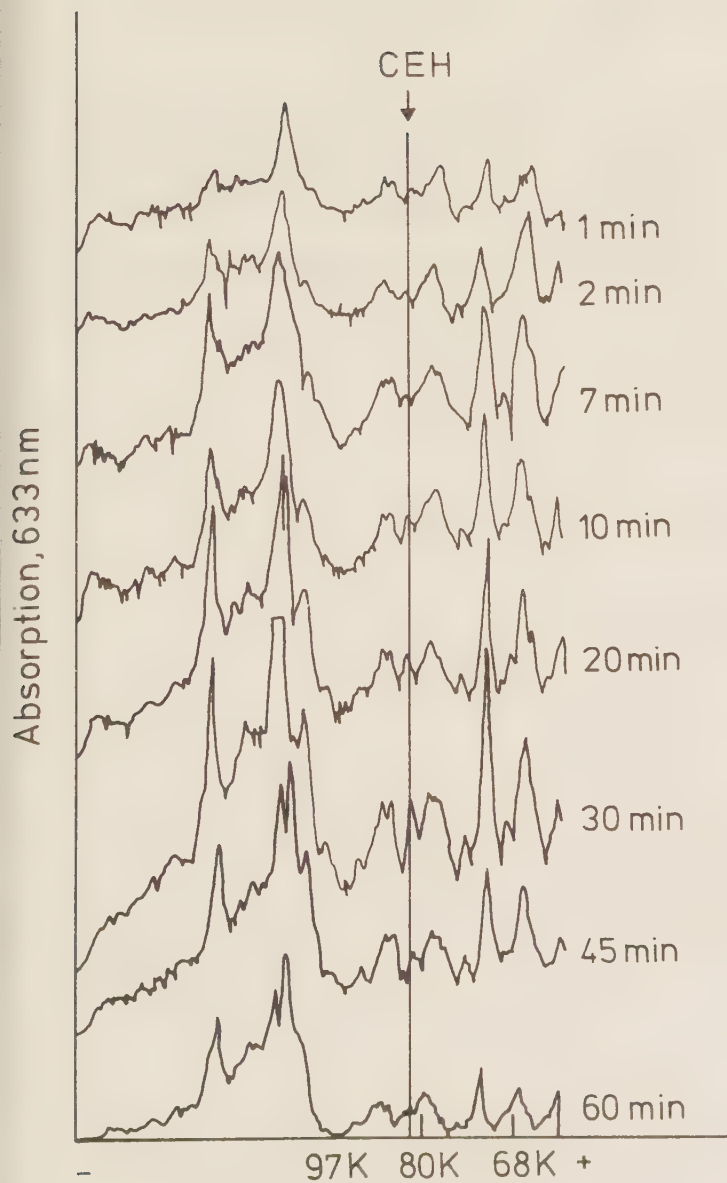


Abb. 24: Densitogramm einer Autoradiographie von einer cAMP-abhängigen Phosphorylierungskinetik des 100 U

Pro Slot wurden 100 μ l G25-Pool (75 μ g Protein) auf eine 7,5%ige SDS-PAGE aufgetragen. Die Positionen der Markerproteine (Phos b: 97 kDa, Transferrin: 80 kDa, BSA: 68 kDa) und der CEH sind durch Striche markiert.

Die Auswertung der Autoradiographie erfolgte nach Methode B (siehe 2.15).

3.2.7.2 Dephosphorylierungskinetik - Einfluß von Phosphataseinhibitoren

Je 2 ml G25-Pool (3 mg Protein) wurden in Gegenwart von 5 mM Mg^{2+} , 10 μM cAMP und 110 μl [$\gamma^{32}P$]ATP (160 μCi , 0,4 mM im Testansatz) 10 min bei 37°C inkubiert. Nach Abtrennung der in der Enzymfraktion enthaltenen Cofaktoren mittels einer G50-Spritze (siehe 2.12) wurden die CEH-Fraktionen mit bzw. ohne Zusatz von Phosphataseinhibitoren bis zu einer weiteren Stunde bei 37°C inkubiert.

Nach den in Abb. 25 angegebenen Zeiten wurden je 50 μl zur Bestimmung des [^{32}P]Phosphatausbaus aus dem Reaktionsansatz entnommen (siehe 2.6.3). Wie in der Abbildung dargestellt, wurde die Dephosphorylierung der im G50-Pool enthaltenen Proteine durch Gegenwart von 100 mM $K-PO_4$, 100 mM NaF, 10 mM GSSG und auch von 100 mM $NaMoO_4$ (nicht gezeigte Daten) in der angegebenen Inkubationszeit verhindert. Ohne Zusätze oder bei Zugabe von 100 μM $ZnCl_2$ war nach 5 min 1/3 des eingebauten [^{32}P]Phosphates wieder ausgebaut worden, und nach 1h betrug die Phosphorylierungsrate nur noch 25% von der des Ausgangswertes (Abb. 25). Die Densitogramme der entsprechenden Autoradiographie der Dephosphorylierungskinetik mit bzw. ohne Zusatz von 100 mM NaF sind in Abb. 26 dargestellt.

Deutlich zu erkennen ist die Abnahme des [^{32}P]Phosphatgehaltes in der 84kDa-Bande bei dem Kontrollansatz (Abb. 26B), bei Anwesenheit von 100 mM NaF ist dagegen keine Veränderung in der Absorptionshöhe der CEH-Bande festzustellen (Abb. 26A). Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den Aktivierungsversuchen in Gegenwart von Phosphataseinhibitoren (siehe 3.2.3.5).

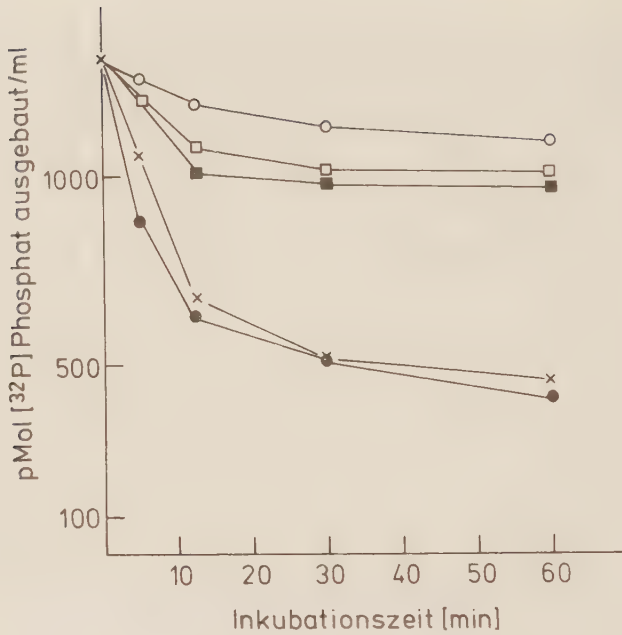


Abb. 25: Dephosphorylierungskinetik vom 100 U

Folgende Zusätze wurden nach der Aktivierung dem G50-Pool zugesetzt:

- — ○ 100 mM NaF
- — □ 10 mM GSSG
- — ■ 100 mM K-PO₄
- — ● 100 μM ZnCl₂
- x — x kein Zusatz

Da wegen des hohen [³²P]Phosphat-Gehaltes im G50-Pool auf eine Proteinbestimmung verzichtet wurde, sind die Ergebnisse pro ml Enzymlösung berechnet.

Absorption, 633 nm

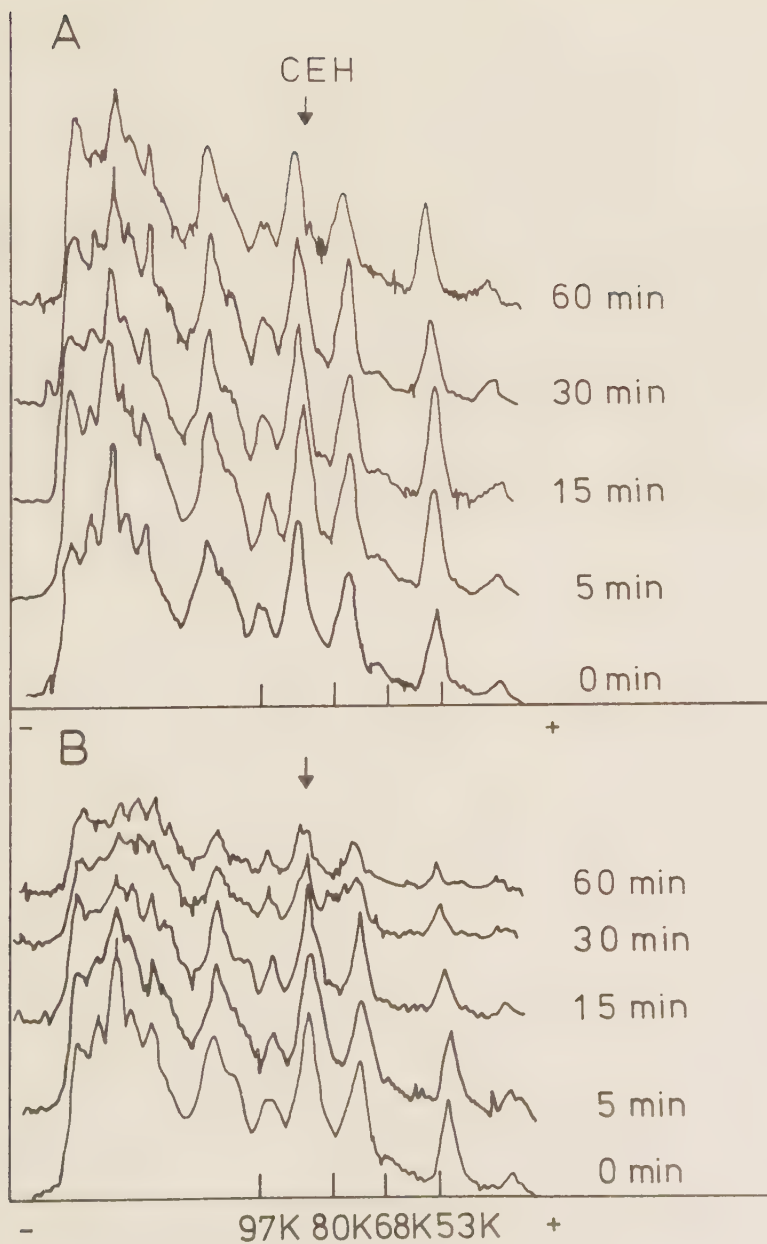


Abb. 26: Densitogramme einer Autoradiographie von einer Dephosphorylierungskinetik

A in Gegenwart von 100 mM NaF

B in Abwesenheit von Phosphataseinhibitoren

Pro Slot wurden 100 μ l des G50-Pools auf eine 10%ige SDS-PAGE aufgetragen. Wegen des hohen [32 P]Phosphatgehaltes wurde in diesem Pool kein Protein bestimmt.

Die Positionen der Markerproteine (Phos b: 97 kDa, Transferrin: 80 kDa, BSA: 68 kDa, Glutamatdehydrogenase: 53 kDa) sind durch Striche markiert, der Pfeil gibt die Position der CEH an.

Die Auswertung der Autoradiographie erfolgte nach Methode B (siehe 2.15).

3.2.7.3 Phosphorylierung des P-11-Durchlaufs

100 μ l P-11-Durchlauf (siehe 3.2.3.7) wurden mit 5 mM Mg^{2+} , 10 μ M cAMP und 3 μ l [γ - ^{32}P]ATP (7 μ Ci, 0,4 mM im Testansatz) 10 min bei 37°C inkubiert, anschließend mit 100 μ l SDS-Probenpuffer versetzt, denaturiert und ein Aliquot auf eine 10%ige SDS-PAGE aufgetragen.

Abb. 27 gibt das Bandenmuster der phosphorylierten Proteine im P-11-Durchlauf nach Autoradiographie wieder. Die Abb. 27A resultiert aus dem gleichen Versuchsansatz, dem jedoch 0,05 U (5 μ l) katalytische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase zugesetzt worden waren.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen aus 3.2.3.7 wurde das CEH-Polypeptid erst nach Zugabe exogener Proteinkinase deutlich phosphoryliert.

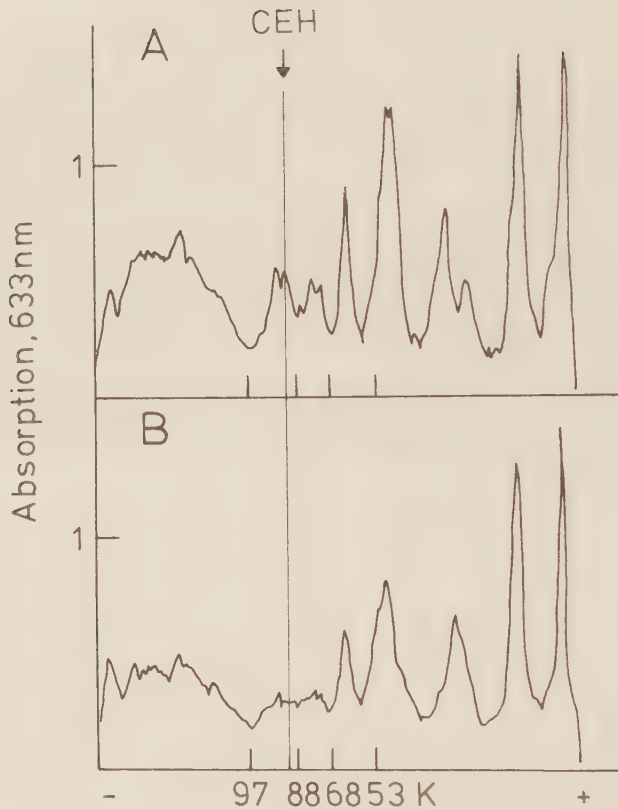


Abb. 27: Densitogramm einer Autoradiographie einer 10%igen SDS-PAGE vom P-11-Durchlauf

A Zusatz von 0,05 U katalytischer Untereinheit aus der Rindernebenniere

B endogene Phosphorylierung des P-11-Durchlaufs

Pro Slot wurden 100 μ l P-11-Durchlauf (45 μ g Protein) aufgetragen

A: 4300 cpm

B: 3100 cpm

Die Position der Markerproteine (Phos b: 97 kDa, Transferrin: 80 kDa, BSA: 68 kDa, Glutamatdehydrogenase: 53 kDa) und der CEH sind durch Striche markiert. Die Auswertung der Autoradiographie erfolgte nach Methode B (siehe 2.15).

4. ERGEBNISSE - TEIL B

Untersuchungen an Y-1 Zellen

4.1 Steroidogenese in Y-1 Zellen

Y-1 Zellen, Tumorzellen der Nebenniere der Maus, sind durch ein Fehlen der 21β -Hydroxylase und eine vermehrte Aktivität der 20α -Hydroxydehydrogenase gekennzeichnet [136], die primären Steroidprodukte dieser Zellen sind deshalb 20α -Hydroxyprogesteron und 11β - 20α -Dihydroxyprogesteron [111,136], beides Steroide, die auch durch einen Fluoreszenztest nachweisbar sind [136,137].

Da die Steroidproduktion erst nach dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Steroidogenese im Vergleich zu normalen Nebennierenzellen der Maus verändert ist, stellen diese Zellen trotzdem ein gutes Modell dar, um die hormonelle Regulation der Steroid-Biosynthese näher zu untersuchen.

Das Arbeiten mit Zellkulturen brachte außerdem eine Reihe von Vorteilen: einfache Züchtung großer Zellmassen, definierte Bedingungen auch bei Langzeitinkubationen und Schaffung von in vivo-Bedingungen ohne Tierversuche.

4.1.1 Dosis-Wirkungs-Kurve von ACTH und db cAMP

Für diesen Versuch wurden die Zellen bei der letzten Vermehrungspassage auf 2 cm Ø Petrischalen umgesetzt (siehe 2.3.2) und nach 5tägiger Wachstumszeit für das Experiment verwendet.

Dem Medium wurde ACTH und db cAMP in den in Abb. 28 angegebenen Konzentrationen zugefügt. Die ACTH-Ansätze enthielten $7,65 \text{ mM Ca}^{2+}$, da auch in diesem System die ACTH-induzierte Steroidogenese Ca^{2+} -abhängig war (nicht gezeigte Daten).

Nach 6h Inkubation bei 37°C wurde das Medium abgenommen und eine Steroidbestimmung durchgeführt (siehe 2.7). Die Steroidsekretion einer Petrischale entsprach ca. 10^6 Zellen.

Beide Dosis-Wirkungs-Kurven (Abb. 28) waren gegenüber denen der suspendierten Nebennierenzellen der Ratte nach höheren Konzentrationen verschoben, auch wurde keine Verminderung der Steroidogenese bei sehr hohen Konzentrationen der steroidogenen Substanzen festgestellt. Maximale Steroidsekretion wurde ab 85 pM ACTH bzw. 2,5 mM db cAMP beobachtet.

Kowal und Fiedler [137] zeigten den gleichen Kurvenverlauf für die ACTH-Wirkung, und Schimmer et al. [41] bestätigten die Ergebnisse auch für die cAMP-Wirkung auf Y-1 Zellen.

Kennzeichnend für Y-1 Zellen war die relativ geringe Stimulierungsrate durch ACTH bzw. db cAMP, die maximal einen Faktor 10 erreichen konnte [111].

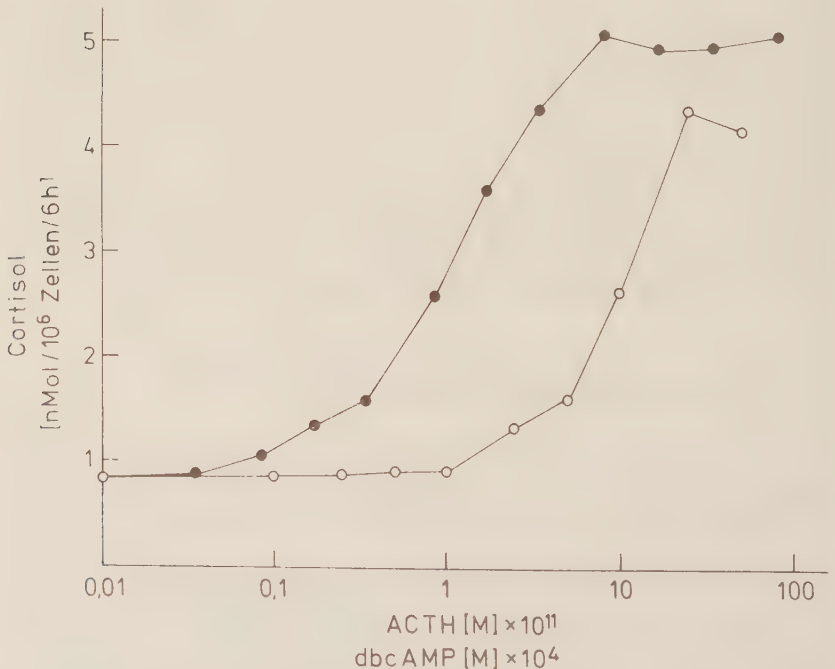


Abb. 28: Abhängigkeit der Steroidproduktion von der ACTH- bzw. db cAMP-Konzentration im Inkubationsmedium

- — ● ACTH, 7,65 mM Ca^{2+}
- — ○ db cAMP

4.1.2 Kinetik der ACTH-induzierten Steroidogenese bei "Normal"-und "LDL-vorinkubierten"-Zellen

Y-1 Zellen besitzen spezifische LDL-Rezeptoren [138] und können deshalb dieses Lipoprotein bevorzugt aufnehmen. In Abwesenheit von Plasma Lipoproteinen wird die Verfügbarkeit des Cholesterins zu einem limitierenden Faktor in der Steroidproduktion dieser Zellen [138]. Da unter den genannten Kulturbedingungen (siehe 2.3.1) den Zellen aber nur relativ wenig LDL zur Verfügung steht, denn Pferdeserum besitzt nur einen geringen LDL-Anteil [136], sind in den Zellen kaum Lipidspeicher vorhanden (Abb.29A), und es kann nicht die maximale Steroidogeneserate erreicht werden [138]. Bei Zugabe von LDL zu den Monolayerkulturen wird bei Abwesenheit von ACTH das LDL-Cholesterin mit intrazellulären Fettsäuren verestert [138] und als Lipidtropfen in der Zelle gespeichert (Abb. 29B). Zur Bestimmung der Steroidogeneserate von "Normal"- und "LDL"-Zellen wurde folgender Versuch durchgeführt. 4 Tage nach Transfer der Zellen auf 2 cm Ø Petrischalen (siehe 2.3.2) wurde ein Teil der Zellen in Ham's F10 Medium inkubiert, das delipidierte Serum enthielt (siehe 2.9). Nach 24 h wurde das Medium entfernt und die Zellen weitere 24 h in Ham's F10 mit LDL (60 µg/ml) (siehe 2.8) inkubiert, danach erfolgte wieder ein Mediumwechsel, und die Zellen wurden bis zu weiteren 13 h in Ham's F10 Medium mit 15% Pferdeserum und 2,5% FKS in Gegenwart bzw. Abwesenheit von ACTH (0,34 nM, 7,65 mM Ca^{2+}) inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die bis zum 6. Tag in Ham's F10 mit 15% Pferdeserum und 2,5% FKS gewachsen waren.

Wie die Abb. 30 zeigt, war die absolute Menge an produzierten Steroiden bei fast allen LDL-Ansätzen auf ca. das Doppelte zu den "Normalzellen" erhöht, so daß der Stimulierungsfaktor durch ACTH bei "Normalzellen" genauso hoch war wie der der "LDL-Zellen". Das Abknicken der ACTH-Kurve der "LDL-Zellen" bei Inkubationen > 4h könnte darauf zurückzuführen sein, daß die Menge an gespeicherten Cholesterinestern allmählich abnahm und somit die Steroidogeneserate der der "Normalzellen" angeglichen wurde.

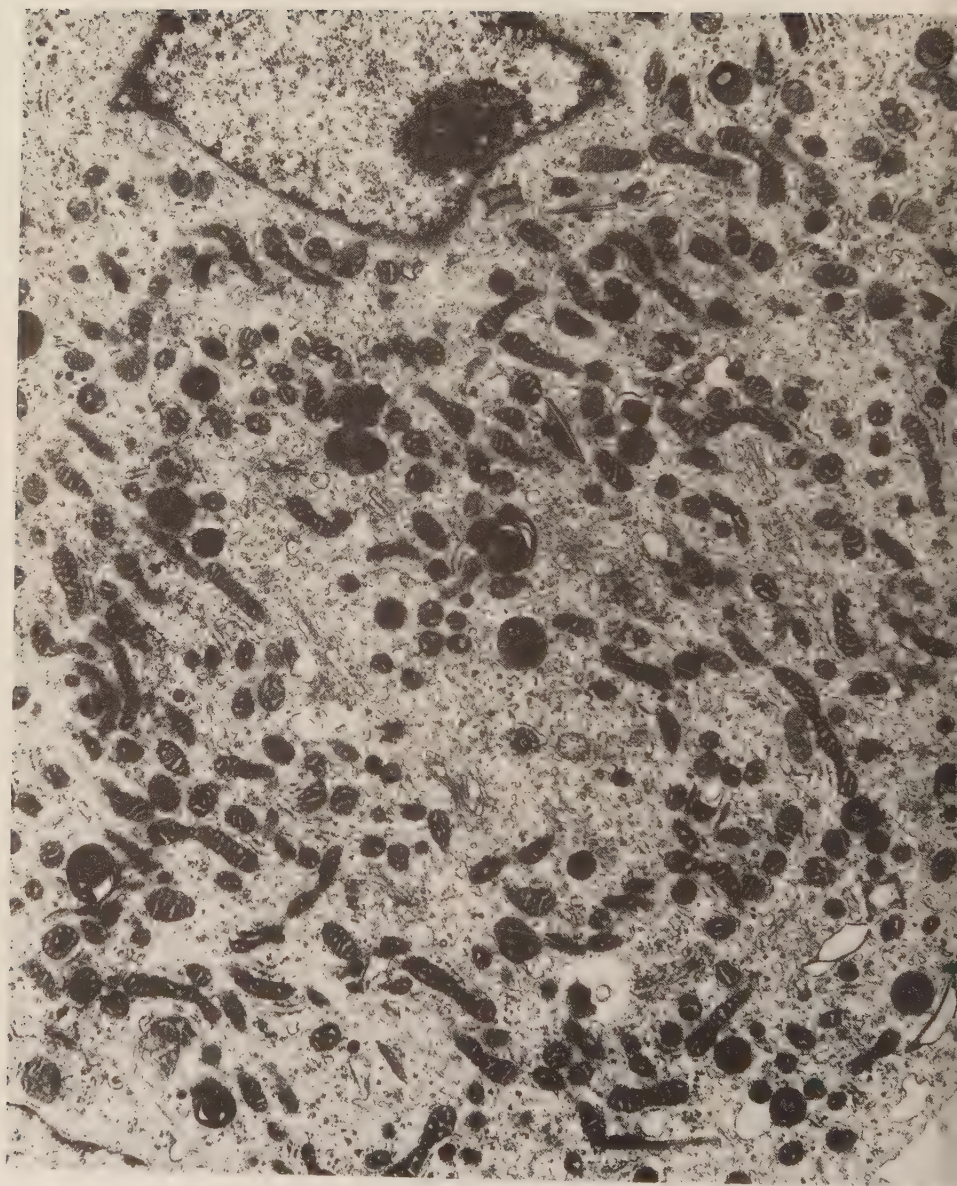


Abb. 29A

Abb. 29: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Y-1 Zellen

A: Zelle unter normalen Kulturbedingungen

B: Zelle nach 24stündiger LDL-Inkubation

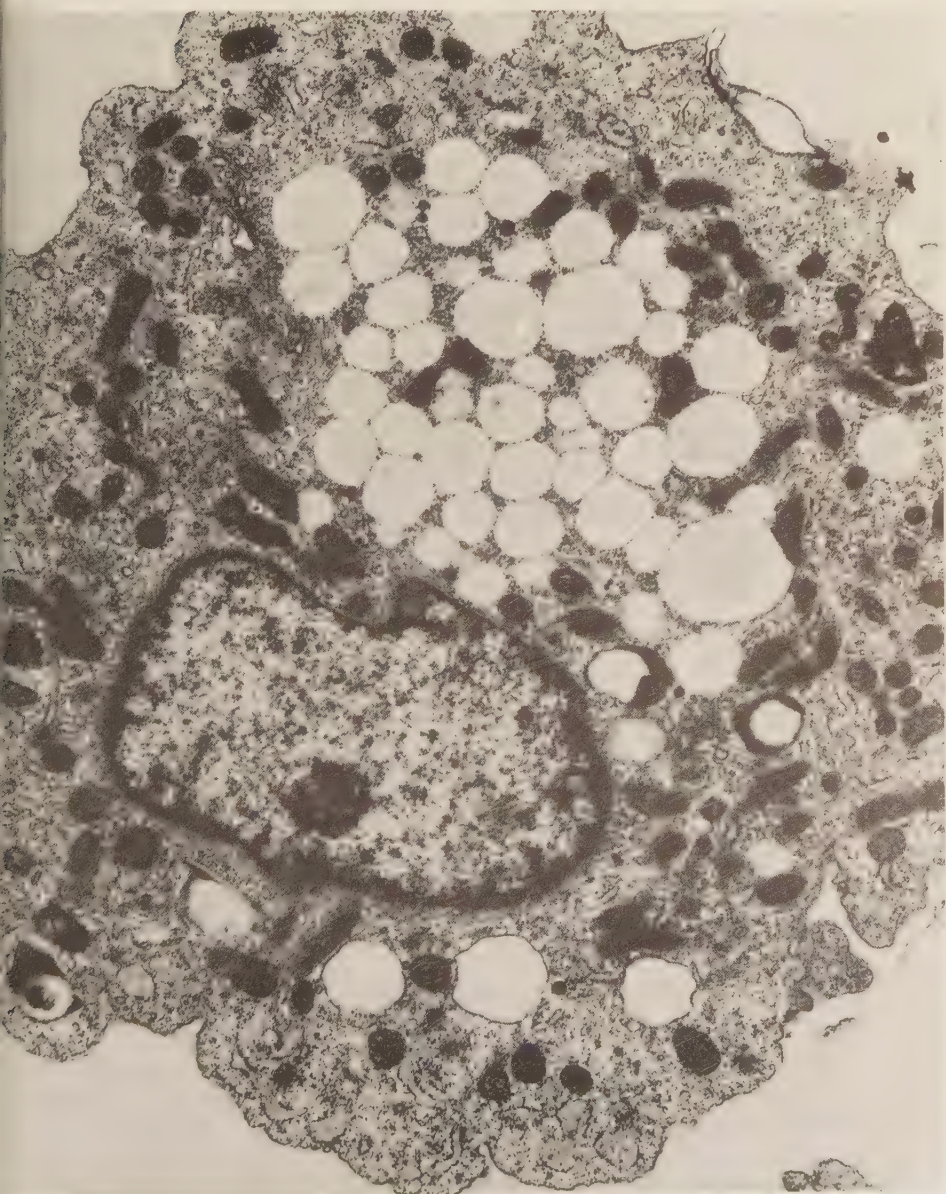


Abb. 29B

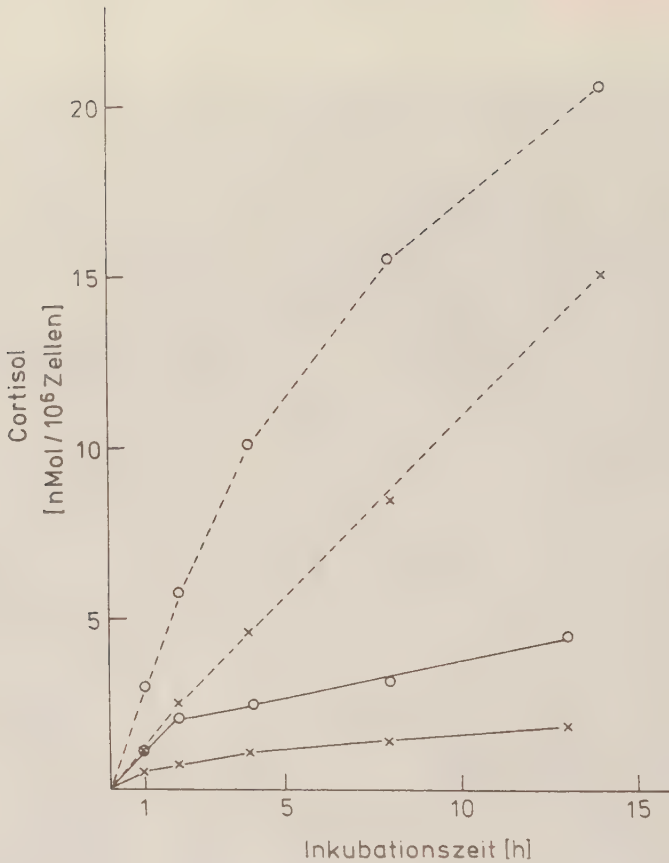


Abb. 30: Abhängigkeit der Steroidproduktion bei "Normal"- und "LDL"-Zellen von der Inkubationszeit

- x — x Normalzellen: ohne Zusätze
- x --- x Normalzellen: 0,34 nM ACTH, 7,65 mM Ca²⁺
- o — o LDL-Zellen : ohne Zusätze
- o --- o LDL-Zellen : 0,34 nM ACTH, 7,65 mM Ca²⁺

4.1.3 Inhibierung der ACTH-induzierten Steroidogenese durch TFP

Wie die ACTH-induzierte Steroidogenese suspendierter Nebennierenzellen der Ratte (siehe 3.1.5) wurde auch die Steroidsekretion bei Y-1 Zellen durch TFP inhibiert (Abb. 31).

Die halbmaximale Hemmkonzentration von $3,5 \times 10^{-5}$ M stimmte mit der für das Rattensystem ermittelten ($4,0 \times 10^{-5}$ M) gut überein.

Hall et al. [139] beobachteten bei dem gleichen Zelltyp 50% Hemmung der ACTH- und auch db cAMP-induzierten Steroidogenese bei $1,5 \times 10^{-5}$ M TFP.

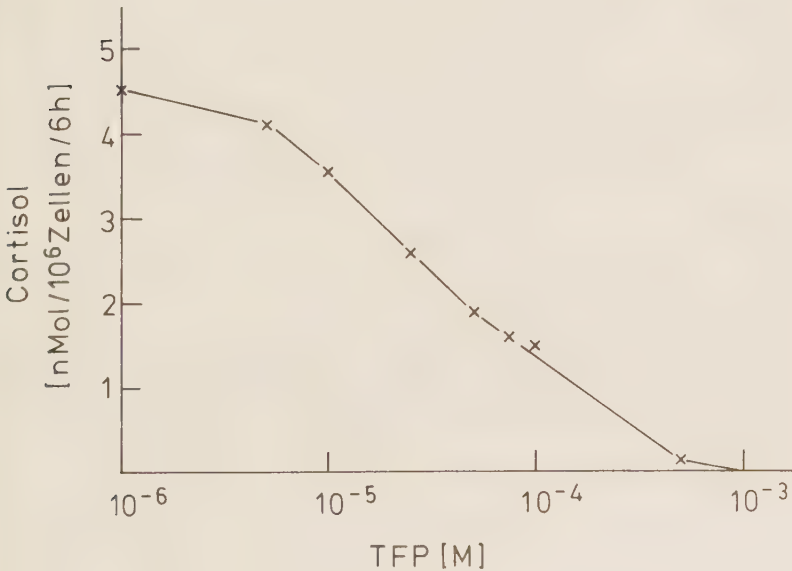


Abb. 31: Abhängigkeit der produzierten Steroide von der im Testansatz enthaltenen TFP-Konzentration

Jede Petrischale enthielt ca. 10^6 Zellen, die 6h in je 2 ml Ham's F10, supplementiert durch Seren, mit 0,34 nM ACTH, 7,65 mM Ca^{2+} und den angegebenen TFP-Konzentrationen inkubiert wurden.

4.1.4 Stimulierung der Steroidogenese durch Cyclo- und Lipoxygenase-Inhibitoren

Die in Abb. 32 dargestellten Abhängigkeiten der Steroidogenese von den Cyclo- bzw. Lipoxygenase-Inhibitor-Konzentrationen zeigen, daß alle drei getesteten Substanzen bei einer Konzentration von 30 μM im Testansatz steroidogene Wirkung besaßen. Indomethazin, ein Cyclooxygenase-Hemmer [140], verursachte die doppelte Steroidsekretion im Vergleich zur Basalaktivität, 4,7,10,13-Eicosatetrainsäure (ETYA), ein Lipoxygenasehemmer [141], und 5,8,11,14-Eicosatetrainsäure (ETYA), ein Inhibitor beider genannten Enzyme [141], vervierfachte sogar die Grundaktivität der Steroidogenese, eine Aktivierung, die der durch ACTH- oder db cAMP-induzierten entsprach. Abb. 33 zeigt die synergistische Wirkung der genannten Substanzen mit 0,34 nM ACTH und 2,5 mM db cAMP. Bei Gegenwart von Indomethazin bzw. den beiden Eicosatetrainsäuren in den db cAMP-Ansätzen wurde die Steroidsekretion auf 11 nMol/10⁶ Zellen/6h erhöht, eine Steroidogeneserate, die 4fach höher war, als die nur mit db cAMP erzielte.

Inkubierte man die Zellen jedoch in Gegenwart von ACTH und den genannten Inhibitoren, wurde keine höhere Steroidsekretion im Vergleich zum ACTH-Wert beobachtet (Abb. 33).

Die erhaltenen Ergebnisse weisen darauf hin, daß möglicherweise auch der Prostaglandin- bzw. Leukotrienstoffwechsel an der Regulation der Steroidogenese beteiligt sein könnte (siehe Diskussion 5.3).

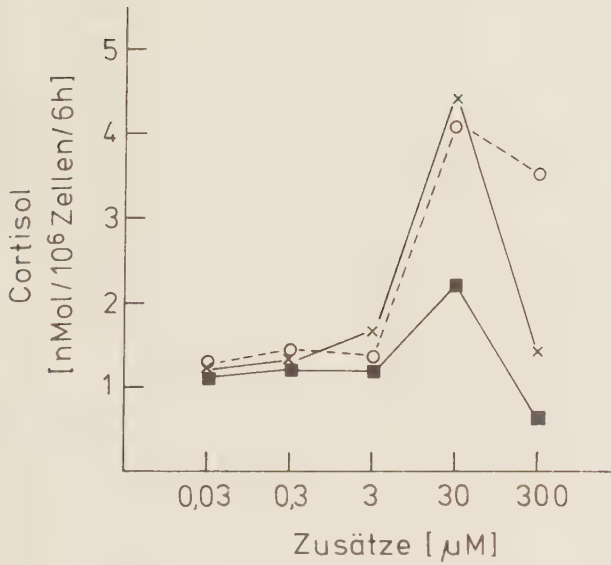


Abb. 32: Abhängigkeit der Steroidogenese von der Indomethazin-, 4,7,10,13- und 5,8,11,14-Eicosatetrainsäure-Konzentration im Testansatz

- o --- o 4,7,10,13-ETYA
- x — x 5,8,11,14-ETYA
- — ■ Indomethazin

10^6 Zellen/Ansatz wurden 6h in 2 ml Ham's F10 Medium mit 15% Pferdeserum und 2,5% FKS in Gegenwart der oben genannten Substanzen inkubiert.

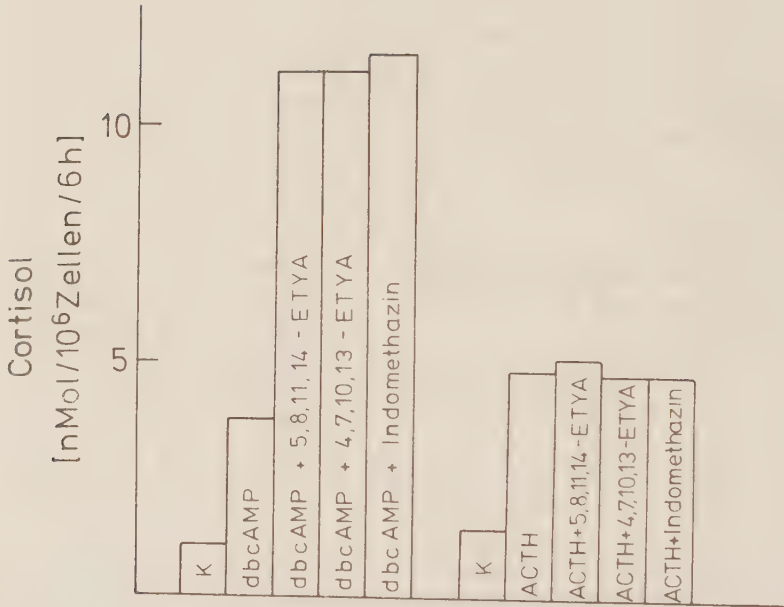


Abb. 33: Synergistische Wirkung von Indomethazin, 4,7,10,13- und 5,8,11,14-Eicosatetrainsäure mit ACTH und db cAMP

Jeder Testansatz (10^6 Zellen) enthielt 2 ml Ham's F10 mit 15% Pferdeserum und 2,5% FKS sowie entweder 0,34 nM ACTH plus 7,65 mM Ca^{2+} oder 2,5 mM db cAMP in Gegenwart von 30 μM der genannten Substanzen. Es wurde die Steroidsekretion nach 6h Inkubation bestimmt.

4.1.5 Einfluß von γ_3 -MSH auf die ACTH-induzierte Steroidogenese

γ_3 -MSH, ein Hormon, das genau wie ACTH in der Hypophyse aus Pro-Opiomelanocortin gebildet wird [22,23], zeigte nach den in diesem Labor ermittelten Daten und auch nach den in der Literatur beschriebenen Versuchen [18] keine steroidogene Wirkung. Bei Zusatz von γ_3 -MSH (10^{-8} M) und ACTH in den Testansatz fand jedoch eine Verstärkung der Steroidsekretion gegenüber den nur mit ACTH ermittelten Werten statt (Abb. 34). Diese Erhöhung der Steroidogenese war von der ACTH-Konzentration abhängig und in einem Konzentrationsbereich von $3,4 \times 10^{-13}$ bis $3,4 \times 10^{-10}$ M ACTH am stärksten ausgeprägt. Die Dosis-Wirkungskurve wurde in diesem Bereich soweit nach links verschoben, daß die ACTH-Konzentration, die für die halbmaximale Steroidogenese benötigt wurde, um mehr als eine halbe Zehnerpotenz verringert war, ein Ergebnis, das mit dem von Farese et al. [18] ermittelten Werten bei suspendierten Nebennierenzellen der Ratte übereinstimmt.

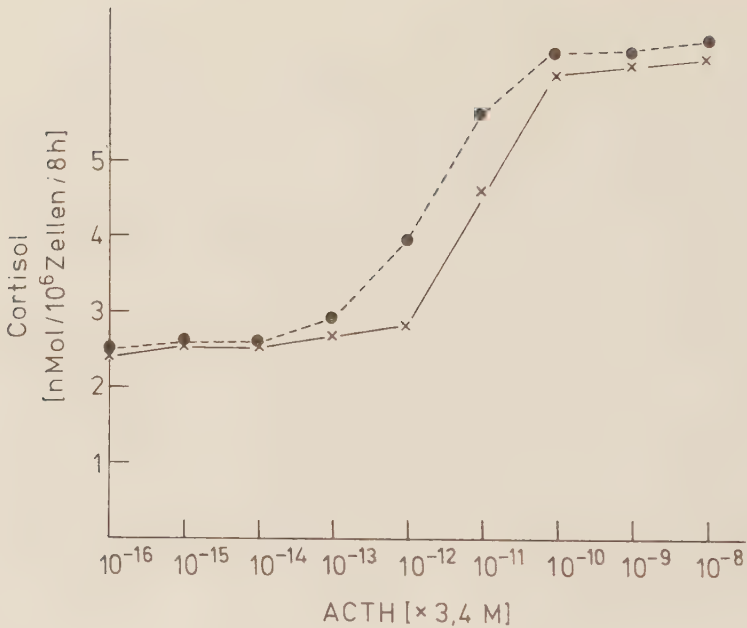


Abb. 34: Abhängigkeit der Steroidogenese von der ACTH-Konzentration in Gegenwart (● --- ●) bzw. Abwesenheit (x — x) von 10⁻⁸ M γ₃-MSH

Jede Petrischale (2 cm Ø, 10⁶ Zellen) enthielt 2 ml Ham's F10 mit Seren, 7,65 mM Ca²⁺, ACTH in den angegebenen Konzentrationen und ggf. 10⁻⁸ M γ₃-MSH.

4.1.6 Einfluß verschiedener Substanzen auf den Abbau endogenen Cholesterinester und auf die dazugehörige Steroidogenese

Ähnlich wie bei dem Versuch in 4.1.2, wurden die Y-1 Zellen 4 Tage nach Überführung in 2 cm Ø Petrischalen 24 h in Ham's F10 mit delipidierten Seren (siehe 2.9) inkubiert, anschließend wurde das Medium entfernt, und es folgte eine weitere

24stündige Inkubation in Ham's F10, das LDL (60 $\mu\text{g/ml}$) (siehe 2.8) und 0,1 mM [^3H]Oleat (siehe 2.10.2.2) enthielt, so daß das LDL-Cholesterin in der Zelle z.T. mit radioaktiver Ölsäure verestert wurde.

Die Bestimmung des Gehaltes an radioaktiv markierten Cholesterinestern erfolgte nach 2.10.2.3.

Abb. 35 zeigt die Kinetik dieser Veresterung; als Kontrolle wurde die Zunahme des Cholesterinestergehaltes von Zellen angegeben, die vor der LDL/[^3H]Oleat-Inkubation nicht in einem Lipoprotein-verarmten Medium inkubiert waren. Beide Zelltypen zeigten zwar einen linearen Anstieg in der Veresterungsrate, jedoch war der absolute Einbau an [^3H]Oleat in Zellen des Ansatzes mit delipidierten Seren fast doppelt so hoch wie in den Kontrollzellen. Für die folgenden Versuche wurden die Zellen, wie in 2.10.2.2 beschrieben, inkubiert; nach der 24 h LDL/[^3H]Oleat-Inkubation wurde das radioaktive Medium entfernt, die Monolayer 2 x mit Ham's F10 gespült und in Medium mit den in Abb. 36-38 angegebenen Zusätzen inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurde von jedem Ansatz der Gehalt an endogenem Cholesterin[^3H]oleat (siehe 2.10.2.3) und die Steroidogeneserate (siehe 2.7) bestimmt.

Im Gegensatz zu den Versuchen von Faust et al. [138], bei denen auch während der ACTH-Inkubation [^3H]Oleat zugegen war, konnte nach diesem Protokoll der "wahre" intrazelluläre Cholesterinesterabbau bestimmt werden und keine Differenz aus Auf- und Abbaurate.

Wie die Abb. 36A und 37A zeigen, wurde durch ACTH ($3,4 \times 10^{-10}\text{M}$) db cAMP ($2,5 \times 10^{-3}\text{M}$), γ_3 -MSH (10^{-8}M) und TPA (10^{-6}M) der Abbau der endogenen Cholesterinester nahezu mit der gleichen Kinetik und dem gleichen Ausmaß beschleunigt, besonders ausgeprägt war dieser Effekt in der ersten Inkubationsstunde.

Interessanterweise nahm auch der Gehalt an Cholesterin[^3H]oleat in den Kontrollzellen ab, wobei die Stabilität des Esterpools auch durch die Anwesenheit von Seren beeinflusst wurde (Abb. 36A). Es ist bekannt, daß Pferdeserum Komponenten enthält, die die Adenylatcyclase aus Lymphoma-Zellen aktivieren können [142].

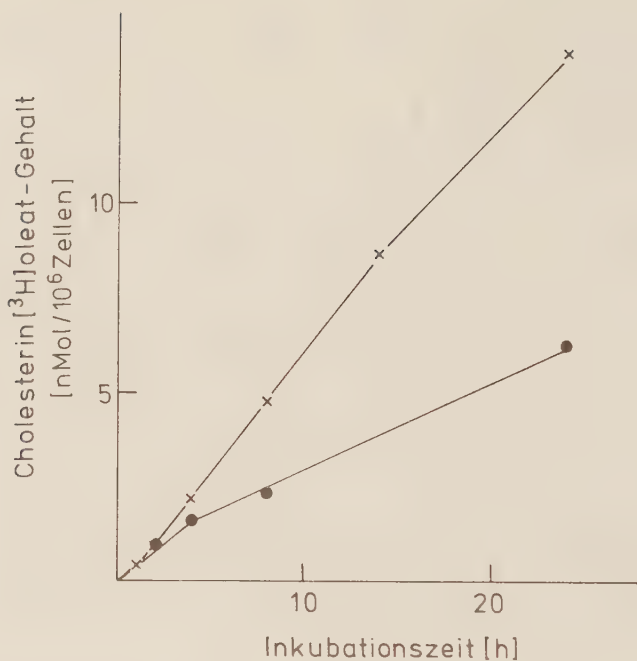


Abb. 35: Zunahme des Gehaltes an endogenem Cholesterin[³H]oleat in Abhängigkeit von der Zeit bei Inkubation in Ham's F10 mit LDL (60 µg/ml) und [³H]oleat (0,1 mM, 10⁴ cpm/ml). Vor Zugabe des LDL/[³H]oleat-Mediums erfolgte eine 24stündige Inkubation in Medium mit "Normal-" (● — ●) bzw. delipidierten (x — x) Seren. Alle weiteren Angaben siehe Text und 2.10.2.

Dieser Effekt ist besonders ausgeprägt, wenn die Zellen zuvor in Serum-freiem Medium inkubiert waren. Möglicherweise ist auch die stärkere Abnahme an Cholesterin[³H]oleat bei Y-1 Zellen in dem "Serum-Ansatz" dadurch erklärbar.

Cycloheximid (Abb. 38A), ein Translationshemmer, und TFP (Abb. 37A) verringerten die Abbaurate. cGMP (Abb. 38A), ein anderer für die Steroidogenese diskutierter "second messenger"

[11,48,49], hatte keinen Einfluß auf den Abbau, wohingegen in Gegenwart von Prostaglandin E_2 (Abb. 38A) im Vergleich zu der Kontrolle eine leicht erhöhte Abnahme der Radioaktivität zu beobachten war.

Die zu diesen Ansätzen gemessenen Steroidogeneseraten sind in den Abb. 36B - 38B wiedergegeben. Besonders hohe Steroidsekretion wurde mit den beiden bekannten Stimulantien ACTH [137] und db cAMP [40] erzielt. Interessant ist der verschiedene Verlauf der beiden Kinetiken (siehe Diskussion 5.3). Mit dem Proteinkinase C aktivierenden Phorbol ester, TPA [143], wurden ebenfalls leicht erhöhte Werte in der Steroidproduktion beobachtet (Abb. 37B). Alle anderen Agentien hatten keinen Einfluß auf die Basalaktivität der Steroidogenese oder hemmten, wie TFP und Cyloheximid (Abb. 37B, 38B), jegliche Steroidausschüttung.

Die in diesem Versuch erhaltenen Daten stehen in engem Zusammenhang mit den Ergebnissen der in vivo-Aktivierung der CEH (siehe 4.3) und werden im Detail unter 5.3 diskutiert.

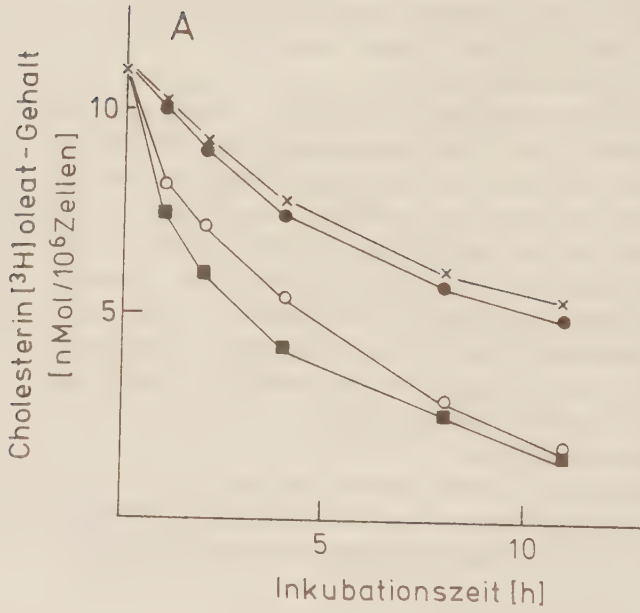


Abb. 3

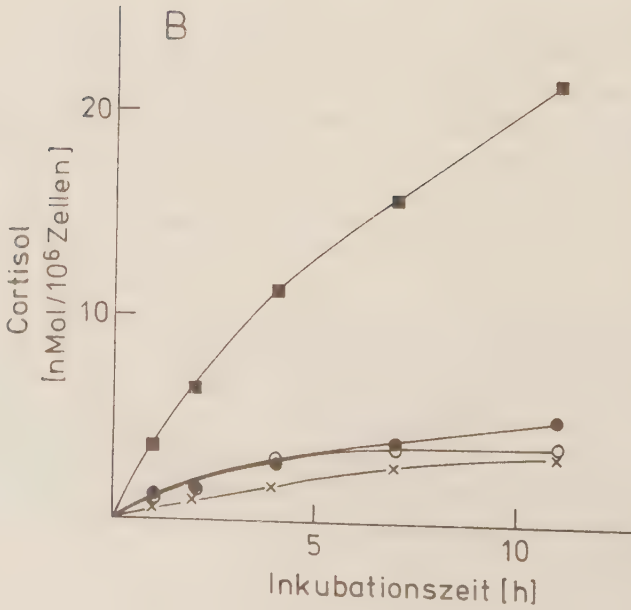


Abb. 36

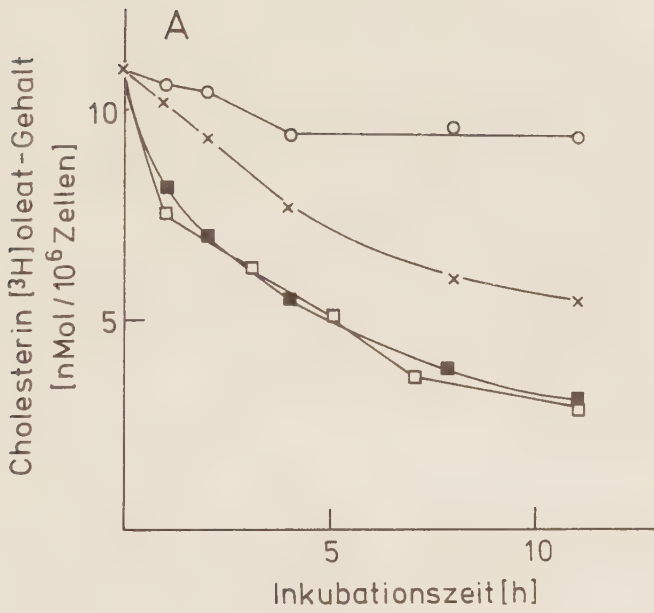


Abb. 37A

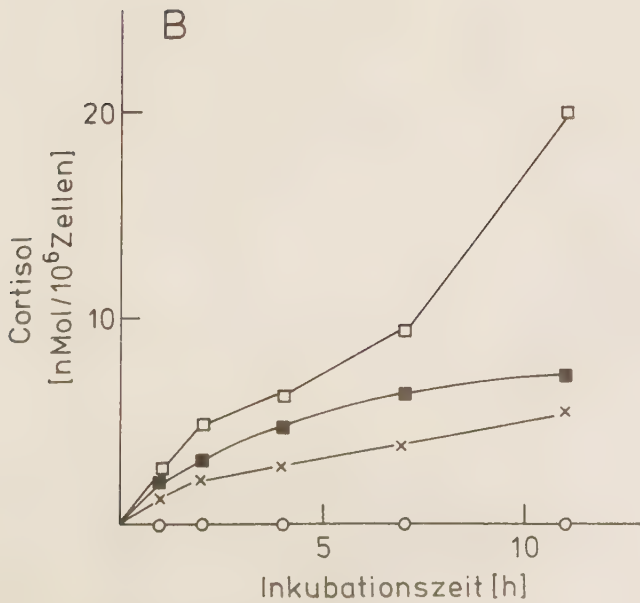


Abb. 37B

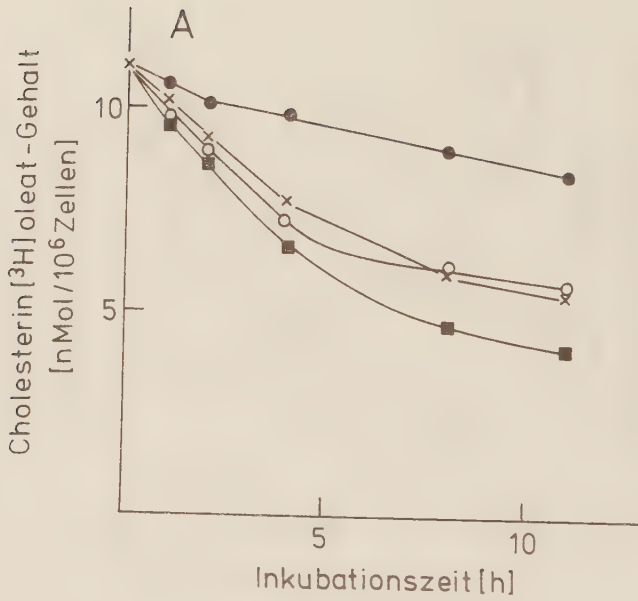


Abb. 2

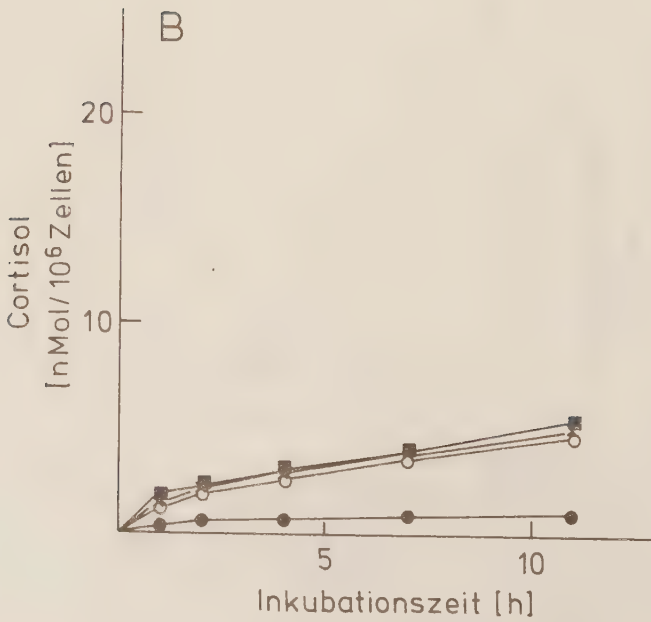


Abb. 3

Abb. 36-38: Kinetik des Abbaus von intrazellulärem Cholesterin [^3H]oleat (A) und der Steroidogenerate (B) bei Einwirkung verschiedener Agentien auf Y-1 Zellen

Die Zellen wurden, wie im Text beschrieben, vorbehandelt und dann wie folgt inkubiert:

Abb. 36 x — x in Ham's F10 ohne Serum
 ● — ● in Ham's F10 mit Serumzugabe
 ■ — ■ in Ham's F10 mit Seren in Gegenwart von $3,4 \times 10^{-10}\text{M}$ ACTH und $7,65 \text{ mM Ca}^{2+}$
 ○ — ○ in Ham's F10 mit Seren in Gegenwart von $10^{-8}\text{M } \gamma_3\text{-MSH}$ und $7,65 \text{ mM Ca}^{2+}$

Abb. 37 in Ham's F10 Medium ohne Seren (x — x) mit folgenden Zusätzen:
 ○ — ○ $5 \times 10^{-4}\text{M}$ TFP
 ■ — ■ 10^{-6}M TPA
 □ — □ $2,5 \times 10^{-3}\text{M}$ db cAMP

Abb. 38 in Ham's F10 Medium ohne Serum (x — x) mit folgenden Zusätzen:
 ○ — ○ $5 \times 10^{-3}\text{M}$ cGMP
 ■ — ■ $5 \times 10^{-5}\text{M}$ PGE_2
 ● — ● 10^{-4}M Cycloheximid

4.2 In vitro-Untersuchungen zur Regulation der CEH im 20 Ü

4.2.1 Verteilung der CEH-Aktivität bei der Präparation des 20 Ü

Bei der Herstellung vom 100 Ü bzw. 20 Ü aus Y-1 Monolayern ergab sich die Schwierigkeit, einen geeigneten Zellaufschluß zu finden, bei dem möglichst viel von der Lipid-assoziierten CEH in den löslichen Überstand überführt wurde.

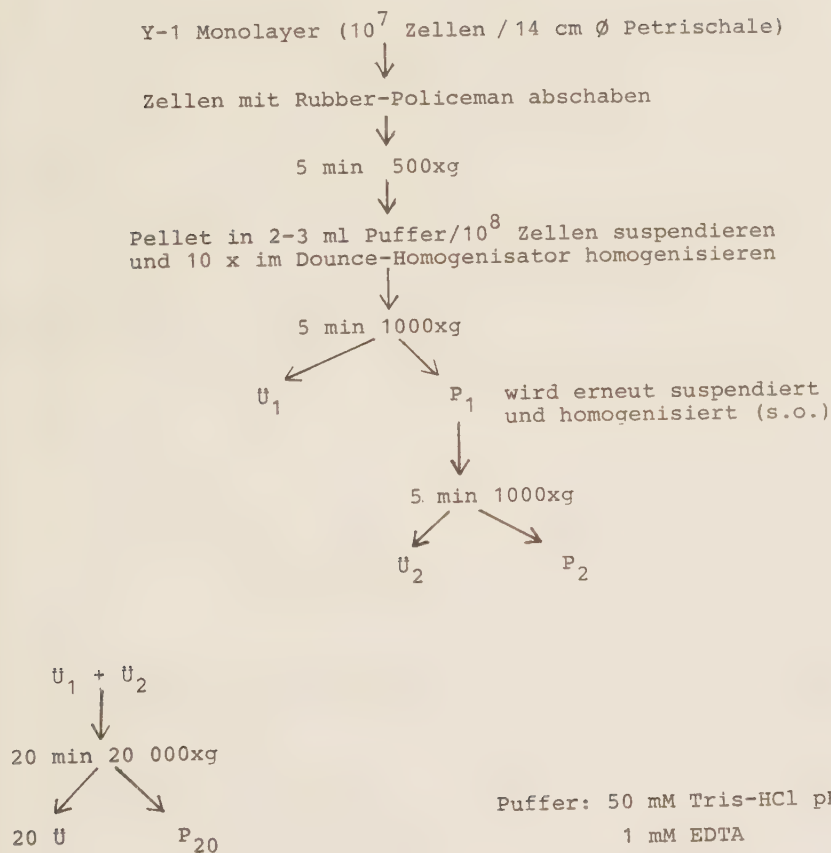
Die Präparation vom 100 Ü ist im Detail unter 2.4.2 beschrieben, die Herstellung eines 20 Ü erfolgte in gleicher Weise und ist nochmals in Abb. 39 dargestellt.

Zur Bestimmung der CEH-Aktivität in den einzelnen Fraktionen wurden die Pellets P_2 und P_{20} in dem angegebenen Puffer suspendiert (2,5 ml/ 10^8 Zellen). Der 20 Ü hatte bei einem Aufschluß von ca. 10^8 Zellen ein Volumen von 5 ml. Von jeder Fraktion wurden 100 µl für den Esterasetest (siehe 2.6.1.3) eingesetzt. Die Aktivitätsverteilung ergab sich wie folgt:

20 Ü (ca. 5 mg/ml)	:	50-70% CEH-Aktivität
P_{20} (ca. 3 mg/ml)	:	20-30% CEH-Aktivität
P_2 (ca. 5 mg/ml)	:	10-20% CEH-Aktivität

Der 20 Ü war Ausgangsmaterial für alle weiteren CEH-Bestimmungen, denn ein 100 Ü konnte bei Y-1 Zellen nicht routinemäßig hergestellt werden, da bei der 100 000xg Zentrifugation die meiste CEH-Aktivität im Pellet sedimentierte und somit im Überstand nur sehr wenig Enzymaktivität nachweisbar war. Der Grund für dieses Verhalten könnten sehr große Lipid-reiche Proteinaggregate sein, die während der Homogenisation entstanden waren und die die Lipid-assoziierte CEH sedimentieren ließen (siehe Diskussion 5.1).

Abb. 39: Präparation vom 20 Ü



Puffer: 50 mM Tris-HCl pH 7,4
 1 mM EDTA
 1 mM EGTA
 1 mM DTE
 5 mM Benzamidin
 250 mM Saccharose

4.2.2 Protein- und Zeitabhängigkeit der CEH-Aktivität

Auch in diesem System wurde bis zu einer Inkubationszeit von 1h ein linearer Anstieg in der CEH-Aktivität beobachtet (Abb. 40). Jeder Testansatz enthielt 100 μ l 20 Ü (450 mg Protein), die, wie in 2.6.1.3 beschrieben, inkubiert wurden.

Die Abhängigkeit des Testes von der Proteinkonzentration gibt die Abb. 41 wieder. Bei einer Testzeit von 60 min stieg die CEH-Aktivität bis zu 1 mg Protein pro Ansatz linear an.

Für Routinebestimmungen wurden nach diesen Ergebnissen ca. 500 μ g Protein eingesetzt und eine Inkubationszeit von 60 min festgesetzt, um auch bei niedrigen CEH-Aktivitäten aussagefähige Ergebnisse zu erhalten.

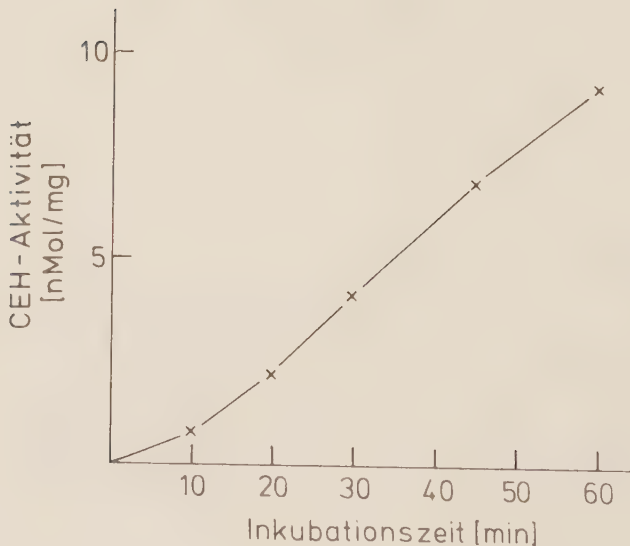


Abb. 40: Abhängigkeit der CEH-Aktivität von der Inkubationszeit

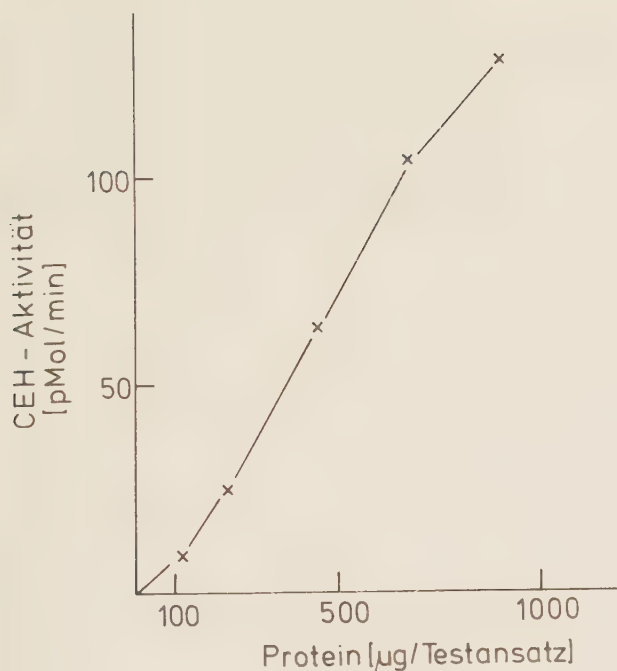


Abb. 41: Abhängigkeit der CEH-Aktivität vom Proteingehalt im Testansatz

4.2.3 Inhibierung der CEH-Aktivität durch TFP

Wie die CEH der Nebennierenrinde der Ratte (siehe 3.2.5) wurde das Enzym auch im 20 Ü der Y-1 Zellen durch TFP inhibiert. Bei einer Konzentrationsabhängigkeit von 10^{-7} bis 10^{-3} M Inhibitor ergab sich eine halbmaximale Hemmung bei einer TFP-Konzentration von $2,2 \times 10^{-5}$ M im Testansatz (Abb. 42).

Pro Ansatz waren 100 μl 20 Ü (450 mg Protein) enthalten; der CEH-Test wurde nach 2.6.1.3 durchgeführt.

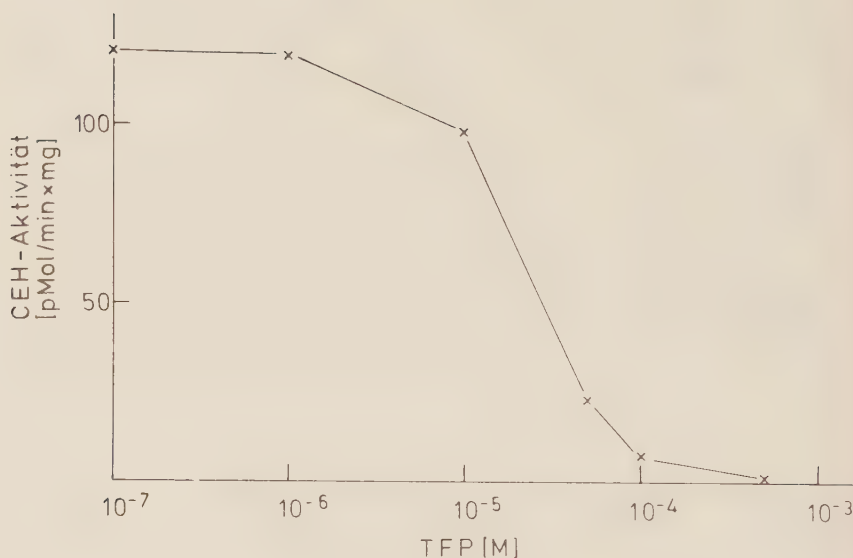


Abb. 42: Abhängigkeit der CEH-Aktivität von der TFP-Konzentration im Testansatz

4.2.4 Gelfiltration eines 20 Ü an Sepharose CL-6B

2 ml 20 Ü (8 mg Protein) wurden auf eine Sepharose CL-6B Säule (105 cm x 1,4 cm) aufgetragen. Der Puffer, der für die Äquilibrierung des Säulenmaterials und zur Elution der Proteine verwendet wurde, war 50 mM Tris-HCL pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTE, 1 mM Benzamidin (siehe 2.11.2). Neben der Bestimmung der CEH- wurde auch die Phosphatase-Aktivität mittels pNPP bestimmt (Abb. 43). Im Gegensatz zu den Ergebnissen vom 100 Ü der Ratte (siehe 3.2.4) und auch zu den in der Literatur beschriebenen Sepharose CL-6B-Profilen von Homogenaten aus

der Rindernebenniere [98], eluierte die Esterase ausschließ-
lich im Ausschlußvolumen V_0 , so daß die Phosphatase-Aktivität
vollkommen abgetrennt war.

Dieses Verhalten könnte auf den Zellaufschluß im Dounce Homo-
genisator (siehe 4.2.1) zurückzuführen sein, bei dem die CEH
so stark mit Lipiden aggregierte, daß nur Komplexe mit einem
Molekulargewicht $> 4 \times 10^6$ Da entstanden (siehe Diskussion 5.1).

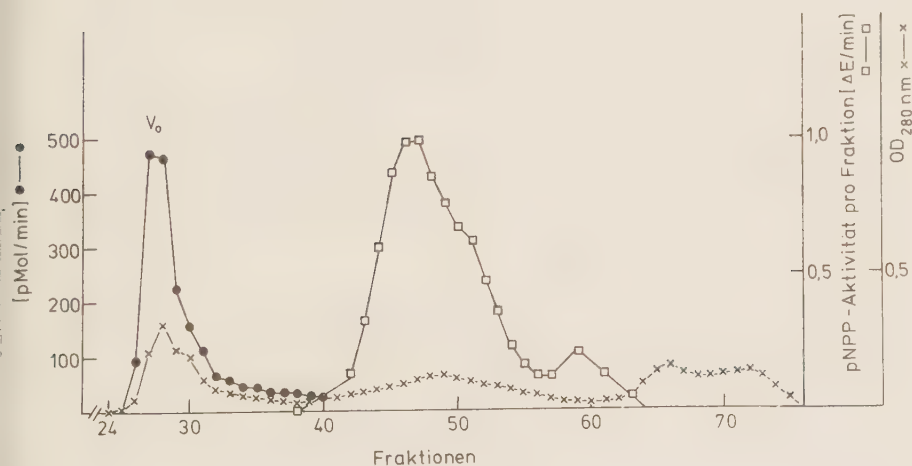


Abb. 43: Gelchromatographie vom 100 Ü an Sepharose CL-6B

4.2.5 Versuche zur Aktivierung der CEH

Die Aktivierungsstudien erfolgten wie im Rattensystem unter Zugabe von Mg^{2+} , ATP und cAMP. Alle unter 3.2.3, 3.2.3.1 und 3.2.3.2 gemachten Angaben bezüglich der Methodik und auch des Enzymverhaltens konnten ausnahmslos auf die Y-1 Esterase übertragen werden, so daß auf diese Ergebnisdarstellung in diesem Abschnitt verzichtet wurde.

4.2.5.1 Kinetik der Aktivierung mit ATP und ATP- γ -S

Im folgenden Versuch wurde die Zeitabhängigkeit der CEH-Aktivität unter Zusatz der verschiedenen Cofaktoren bestimmt (Abb. 44) Abb. 44A zeigt die Zunahme der Enzymaktivität in absoluten Werten, in Abb. 44B ist diese Zunahme prozentual zu dem jeweils ermittelten Mg^{2+} -Wert aufgetragen.

Wie auch im Rattensystem (siehe 3.2.3.4) wurde schon durch Mg^{2+} -Zugabe allein eine leichte Erhöhung der Enzymaktivität beobachtet, aber erst der Zusatz von allen drei Cofaktoren führte zur maximalen CEH-Aktivität, so daß man auch bei der Y-1 Esterase eine cAMP-abhängige Phosphorylierung des Enzyms (siehe 4.2.6) postulieren darf.

Interessant war der biphasische Verlauf in den Aktivierungskinetiken. Zwischen 40 und 60 min Inkubation wurde eine höhere Stimulierungsrate durch Cofaktorzugabe erzielt als während der ersten 40 min. Bei Aktivierungen mit ATP- γ -S wurden, wie schon berichtet (siehe 3.2.3.4), schlechtere Aktivierungsraten beobachtet als bei den entsprechenden ATP-Ansätzen.

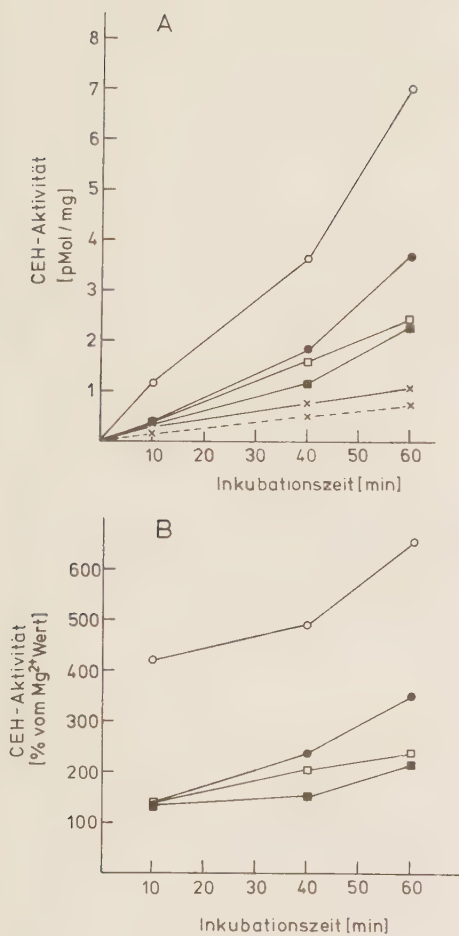


Abb. 44

Abb. 44:

A

Zeitabhängigkeit der CEH-Aktivität bei Zusatz von	
Mg^{2+}	x — x
Mg^{2+} , ATP	□ — □
Mg^{2+} , ATP- γ -S	■ — ■
Mg , ATP, cAMP	○ — ○
Mg , ATP- γ -S, cAMP	● — ●
Grundaktivität	x --- x

B Kinetik der Aktivierung, berechnet auf den für die jeweilige Zeit bestimmten Mg^{2+} -Wert (100%)

Mg^{2+} , ATP	□ — □
Mg^{2+} , ATP- γ -S	■ — ■
Mg^{2+} , ATP, cAMP	○ — ○
Mg^{2+} , ATP- γ -S, cAMP	■ — ●

Pro Inkubationsansatz wurden 400 μ g Protein (230 μ l G25-Pool) eingesetzt. Die Cofaktorkonzentrationen betrugen 5 mM Mg^{2+} , 1 mM ATP bzw. 0,5 mM ATP- γ -S und 10 μ M cAMP.

4.2.5.2 Einfluß von Phosphataseinhibitoren auf die Aktivierung

Zugabe von 100 mM $K-PO_4$ bzw. 100 mM $NaMoO_4$ zu den Aktivierungsansätzen verringerte zwar die absoluten CEH-Aktivitäten, erhöhte aber die prozentuale Stimulierbarkeit durch Mg^{2+} , ATP und Mg^{2+} , ATP, cAMP.

Die Ergebnisse sind im einzelnen in der Tab. 8 dargestellt. Die z.T. sehr niedrigen absoluten Werte sind wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß die zugesetzten Phosphataseinhibitoren die Form des BSA-Substrates so veränderten, daß es für die CEH nur sehr schlecht zugänglich war. Bezogen auf den Mg^{2+} -Wert wurde in Gegenwart von 100 mM $K-PO_4$ und Zusatz aller Cofaktoren eine Aktivitätssteigerung auf 267% und bei 100 mM $NaMoO_4$ sogar auf 498% beobachtet. Führte man die Aktivierung ohne Inhibitoren durch, wurde dagegen nur eine Aktivität von 175% erzielt (siehe auch 3.2.3.5).

Auch diese Ergebnisse stimmen mit der Phosphorylierungstheorie der CEH gut überein (siehe Diskussion 5.3).

Tabelle 8 Aktivierung der CEH in Gegenwart von Phosphataseinhibitoren

Zusätze	-		100 mM K-PO ₄		100 mM NaMoO ₄	
	CEH-Aktivität pMol/min x mg	%	CEH-Aktivität pMol/min x mg	%	CEH-Aktivität pMol/min x mg	%
-	105	100	44	100	29	100
Mg ²⁺	135	129	78	177	26	91
Mg ²⁺ , ATP	178	170	120	273	54	188
Mg ²⁺ , ATP, CAMP	238	227	208	472	130	451

Der CEH-Test wurde mit je 250 µg Protein (200 µl G25-Pool) in 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTE, 5 mM Benzamidin durchgeführt. Die Cofaktorkonzentrationen betragen 2 mM Mg²⁺, 1 mM ATP und 10 µM CAMP.

4.2.5.3 Rekombinationsversuche zur Aktivierung nach Abtrennung der katalytischen Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase

6 ml G25-Pool (8 mg Protein) wurden 1h bei 4°C mit 1 mM cAMP inkubiert. Nach Abnahme eines Aliquots für die CEH-Bestimmung wurden die restlichen 4 ml in 0,5 ml Phosphocellulose P-11 (siehe 2.11.5) eingerührt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 4°C wurden die nicht an P-11 gebundenen Proteine mittels einer Nutsche abgesaugt. Die katalytische Untereinheit der durch cAMP dissoziierten cAMP-abhängigen Proteinkinase blieb unter den genannten Bedingungen an dem Gelmaterial gebunden und konnte mit einem 0,5 M NaCl-Stoß eluiert werden (siehe auch 3.2.3.7). Tab. 9 gibt die Aktivierungsschemata des G25-Pools und des P-11-Durchlaufs mit und ohne Zugabe exogener katalytischer Untereinheit wieder. Zur besseren Aktivierbarkeit wurde jedem Ansatz 100 mM K-PO₄ zugesetzt (siehe 4.2.5.2).

Bei Gegenwart aller Cofaktoren wurde im G25-Pool eine 3,5fache Aktivitätssteigerung im bezug zum Mg²⁺-Wert erzielt. Nach Abtrennung der katalytischen Untereinheit zeigte dieser Pool unter den gleichen Testbedingungen nur noch eine um 16% höhere Aktivität als die Kontrolle, im Rekombinationsversuch dagegen wurde durch Zugabe 0,1 U katalytischer Untereinheit aus der Rindernebenniere wieder eine 2,6fache Aktivierung beobachtet.

Rekombinationsversuche mit der endogenen katalytischen Untereinheit konnten nicht ausgewertet werden, da das NaCl-Eluat auch noch ungefähr 20% stimulierbare CEH-Aktivität enthielt und somit keine genauen Aktivierungsdaten ermittelt werden konnten (siehe auch 3.2.3.7).

Tabelle 9 CEH-Aktivierung vor und nach Abtrennung der katalytischen Untereinheit
- Rekombinationsversuch

Zusätze	G25		P-11-Durchlauf		P-11-Durchlauf + 0,1 U kat. UE	
	CEH-Aktivität pMol/min x mg	%	CEH-Aktivität pMol/min x mg	%	CEH-Aktivität pMol/min x mg	%
cAMP	20	100	16	100	19	100
Mg ²⁺ , cAMP	22	110	19	119	20	105
Mg ²⁺ , ATP, cAMP	76	380	22	137	52	274
				116		260

Der Testansatz enthielt 200 µl G25-Pool (240 µg Protein) bzw. 200 µl P-11-Durchlauf (140 µg Protein); die Cofaktorkonzentrationen betrugen 5 mM Mg²⁺, 1 mM ATP und 10 µM cAMP. Im Rekombinationsversuch wurde dem Ansatz 10 µl (0,1 U) katalytische Untereinheit zugesetzt (präpariert von Herrn Dr. M. Hiep aus der Nebennierenrinde des Rindes).

4.2.6 In vitro-Phosphorylierung der CEH

Auch im 20 Ü der Y-1 Zellen wurde unter Zugabe von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ein $[\text{}^{32}\text{P}]\text{Phosphateinbau}$ in die 84 kDa-Bande beobachtet.

Der Einbau konnte durch cAMP-Zusatz um ein Vielfaches gesteigert werden, so daß unter 4.2.6.1 und 4.2.6.2 nur die cAMP-abhängige Phosphorylierung näher untersucht wurde.

4.2.6.1 Phosphorylierungskinetik

2 ml G25-Pool (7 mg Protein) wurden mit 5 mM Mg^{2+} , 10 μM cAMP und 100 μl $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (100 μCi , 0,4 mM im Test) in Gegenwart von 100 mM K-PO_4 bis zu 1h bei 37°C inkubiert.

Zu den in Abb. 45 und 46 angegebenen Zeiten wurden jeweils 50 μl aus dem Testansatz entnommen und nach 2.6.3 die endogene Phosphorylierungsrate bestimmt. Weitere entnommene 50 μl wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt, denaturiert und auf eine 7,5%ige SDS-PAGE aufgetragen.

Abb. 45 gibt den $[\text{}^{32}\text{P}]\text{Phosphateinbau}$ in den G25-Pool nach den verschiedenen Inkubationszeiten wieder, Abb. 46 zeigt die Densitogramme der entsprechenden Autoradiographie. Zur besseren Darstellung sind in Abb. 46B nur Densitogramm-Ausschnitte, die den Molekulargewichtsbereich von ca. 50-110 kDa zeigen, wiedergegeben.

Im Gegensatz zur Aktivierungskinetik (siehe 4.2.5.1), bei der erst nach 1h die höchste CEH-Stimulierung beobachtet wurde, erreichte der $[\text{}^{32}\text{P}]\text{Phosphateinbau}$ sein Maximum zwischen 30 und 45 min Inkubation (Abb. 45), und auch der Einbau in die 84 kDa-Bande korrelierte mit diesem Ergebnis (Abb. 46).

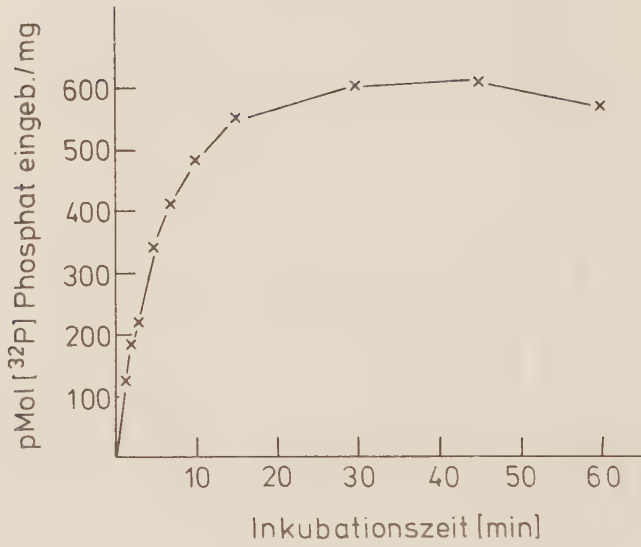


Abb. 45: Kinetik der endogenen Phosphorylierung vom
20 Ü in Gegenwart von cAMP

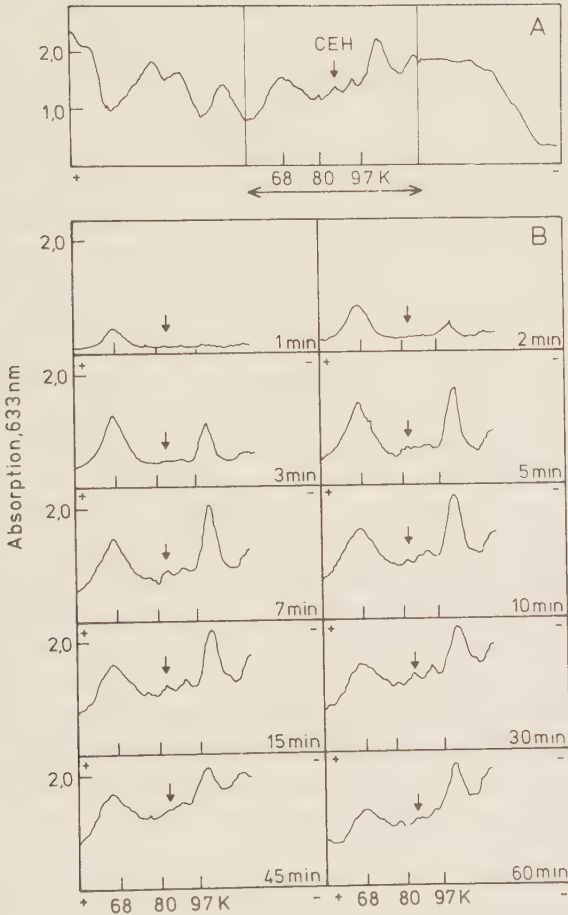


Abb. 46: Densitogramme einer Autoradiographie einer cAMP-abhängigen Phosphorylierungskinetik
Pro Slot wurden 100 μ l G25-Pool (175 μ g Protein) auf eine 7,5%ige SDS-PAGE aufgetragen.

A : Densitogramm eines gesamten Gelslots nach einer Phosphorylierungszeit von 30 min

B : Phosphorylierungskinetik der Proteinbanden von dem in A markierten Densitogramm-Ausschnitt

Als Markerproteine wurden Phos b (97 kDa), Transferrin (80 kDa) und BSA (68 kDa) verwendet, deren Positionen als Striche auf den jeweiligen Abszissen markiert sind. Die 84 kDa-Bande ist durch einen Pfeil angedeutet. Die Auswertung der Autoradiographie erfolgte nach Methode C (siehe 2.15).

4.2.6.2 Dephosphorylierungskinetik

2 ml G25-Pool (7 mg Protein) wurden in Gegenwart von 5 mM Mg^{2+} , 10 μ M cAMP, 120 μ l $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (120 μ Ci, 0,4 mM im Test) und 100 mM $K\text{-PO}_4$ 20 min bei 37°C inkubiert, anschließend wurden die Cofaktoren und der Phosphatpuffer mittels einer Sephadex G50-Spritze (siehe 2.12) von der Enzymfraktion abgetrennt und der G50-Pool bis zu einer weiteren Stunde bei 37°C inkubiert.

Nach den in Abb. 47 und 48 angegebenen Zeiten wurden jeweils 50 μ l aus dem Reaktionsansatz entnommen und nach 2.6.3 der Gehalt an proteingebundenem $[\text{}^{32}\text{P}]\text{Phosphat}$ bestimmt, weitere 50 μ l wurden nach Zugabe von SDS-Probenpuffer denaturiert und auf eine 7,5%ige SDS-PAGE aufgetragen.

Abb. 47 zeigt die Kinetik des $[\text{}^{32}\text{P}]\text{Phosphatausbaus}$ aus der Proteinfraction. Nach 1h Inkubation betrug der $[\text{}^{32}\text{P}]\text{Phosphat}$ -gehalt nur noch 35% vom Ausgangswert. Welche Proteinbanden im einzelnen von dieser Dephosphorylierung betroffen waren, geben die Densitogramme der Abb. 48B und 48C wieder.

Zur besseren Darstellung sind wiederum nur Densitogrammausschnitte aus dem für die CEH relevanten Molekulargewichtsbe-
reich wiedergegeben (Abb. 48C). Abb. 48A zeigt im Vergleich dazu das Bandenmuster eines $[\text{}^3\text{H}]\text{DFP}$ -markierten G25-Pools.

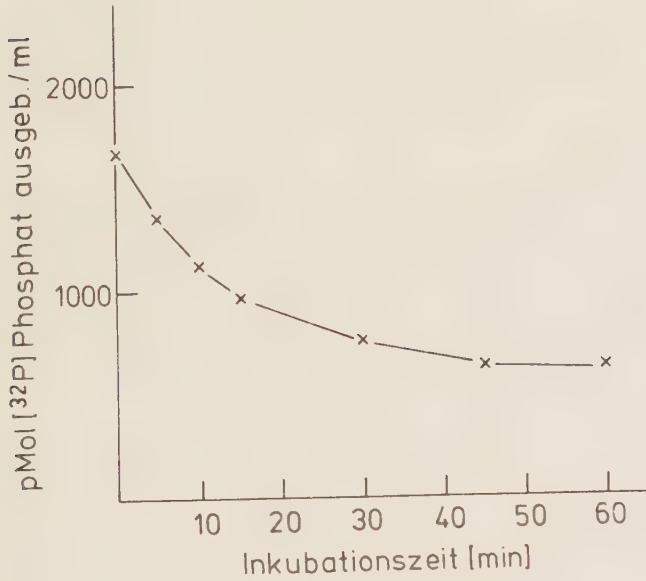


Abb. 47: Dephosphorylierungskinetik vom 20 Ü

Da wegen des hohen [^{32}P]Phosphatgehaltes auf eine Proteinbestimmung verzichtet wurde, sind die Ergebnisse pro ml Enzymlösung berechnet.

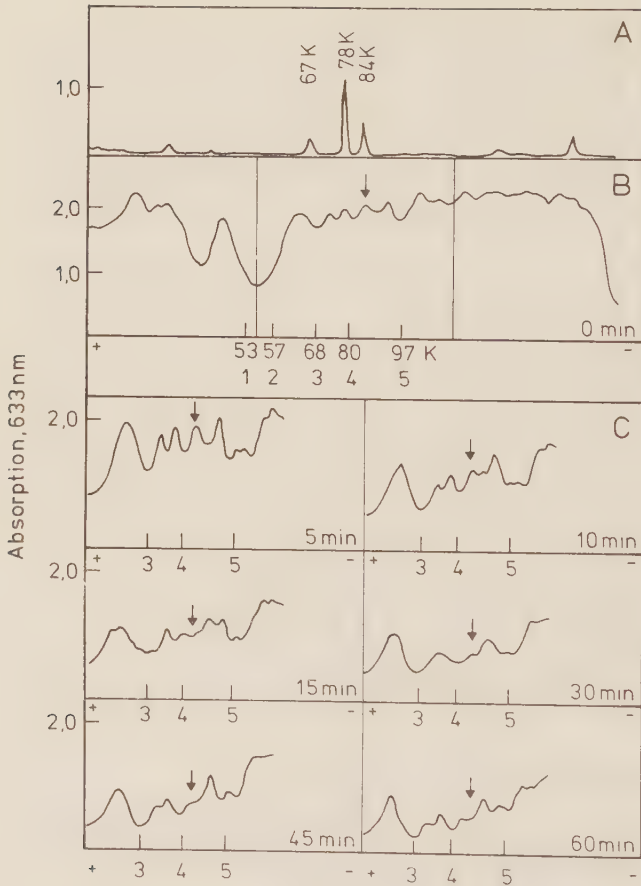


Abb. 48

Abb. 48: Densitogramme von einer Fluorographie der
Dephosphorylierungskinetik

- A [^3H]DFP markierter G25-Pool (135 μl Protein, 7500 cpm)
- B Densitogramm eines gesamten Gelslots vom G50-Pool sofort nach Abtrennung der Cofaktoren (0 min 37°C)
- C Dephosphorylierungskinetik der Proteinbanden von dem in B markierten Densitogramm-Ausschnitt.

Pro Slot wurden in B und C jeweils 100 μl G50-Pool auf eine 7,5%ige SDS-PAGE aufgetragen. Wegen des hohen [^{32}P]Phosphatgehaltes wurde keine Proteinbestimmung durchgeführt.

Die Position der Markerproteine (1. Glutamatdehydrogenase 53 kDa, 2. Pyruvat-Kinase 57 kDa, 3. BSA 68 kDa, 4. Transferrin 80 kDa, 5. Phos b 97 kDa) sind durch Striche auf den Abszissen markiert. Die Pfeile geben die Position der CEH-Bande an.

Ausgewertet wurde die Fluorographie nach der Methode C (siehe 2.15).

4.3 In vivo-Stimulierung der CEH durch ACTH, db cAMP, γ_3 -MSH und TPA

Y-1 Monolayer wurden 7 min, wie in Tab. 10 angegeben, mit ACTH, db cAMP, γ_3 MSH, TPA und PA bei 37°C inkubiert. Da die rezeptorvermittelte ACTH-Wirkung innerhalb weniger Minuten abläuft [47,50,65,144], wurde eine relativ kurze Inkubationszeit gewählt, außerdem konnten so bessere Vergleiche mit den Studien von Pedersen und Brownie [19,21] angestellt werden, die die CEH-Aktivität in hypophysektomierten Ratten untersucht hatten.

Nach der Stimulierung wurde, wie in Abb. 39 angegeben (siehe 4.2.1), der 20 Ü hergestellt. Dem Homogenisationspuffer war 100 mM K-PO₄ zugesetzt, um Dephosphorylierungsreaktionen weitgehendst zu hemmen (siehe 4.2.5.2). Nach der Entsalzung des Überstandes auf einer Sephadex G25-Säule (Äquilibrierungspuffer s.o.) wurde sofort die CEH-Aktivität bestimmt. Tab. 10 gibt die ermittelten Daten wieder.

ACTH, db cAMP und TPA stimulierten die Enzymaktivität um ca. 50-70%, bei der γ_3 -MSH-Einwirkung wurde eine Aktivierung um 30% beobachtet, eine Stimulierungsrate, die auch für die CEH hypophysektomierter Ratten [19,21] ermittelt wurde.

PA, ein Phorbolester, der weder eine Tumor-auslösende Wirkung besitzt [145], noch in der Lage ist, die Proteinkinase C zu aktivieren [146], erhöhte auch nicht die CEH-Aktivität.

Die erhaltenen Ergebnisse korrelieren gut mit den Daten aus dem Cholesterinesterabbau-Versuch in 4.1.6 (siehe Diskussion 5.3).

Tabelle 10 In vivo-Stimulierung der CEH

Zusätze	CEH-Aktivität	
	pMol/min x mg	%
-	18,8 $\pm$ 1,5	100
ACTH	31,2 $\pm$ 1,9	166
γ_3 -MSH	23,8 $\pm$ 1,4	127
db cAMP	28,2 $\pm$ 1,6	150
TPA	31,2 $\pm$ 1,6	166
PA	19,0 $\pm$ 1,5	100

Y-1 Zellen wurden 7 min in Ham's F10 Medium mit 15% Pferdeserum und 2,5% FKS (10 ml pro Petrischale, 14 cm $\emptyset$) mit folgenden Zusätzen inkubiert:

$3,4 \times 10^{-10}$ M ACTH, 7,5 mM Ca^{2+}
 10^{-8} M γ_3 -MSH, 7,5 mM Ca^{2+}
 $2,5 \times 10^{-3}$ M db cAMP
 10^{-6} M TPA
 10^{-6} M PA

Pro Versuchsgruppe wurde von 6 Petrischalen der 20 ü hergestellt.

Im CEH-Test wurden jeweils 250 μg Protein eingesetzt, was einer Zellzahl von $2,5 \times 10^6$ Zellen entsprach.

4.4 Bestimmung der Proteinkinase C-Aktivität in γ_3 -MSH-behandelten Zellen

Y-1 Monolayer wurden 7 min in Gegenwart bzw. Abwesenheit von 10^{-8} M γ_3 -MSH in Ham's F10 Medium mit Seren inkubiert (je 6 14 cm Ø Petrischalen pro Gruppe). Anschließend wurde sofort der 100 Ü präpariert (siehe 2.4.2), wovon 2 ml (4,5 mg Protein) auf eine DEAE-Cellulose Säule aufgetragen wurden (siehe 2.11.4). Nach Sammeln des Durchlaufs wurde die Säule mit 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTE, 2 mM Benzamidin und 10^{-5} M cAMP gespült, um die katalytische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase zu eluieren. Anschließend wurde ein linearer 0-400 mM KCl-Gradient im gleichen Puffer angelegt.

Die gemessenen Proteinkinase C-Profile nach dieser Elution zeigt die Abb. 49. Ungefähr 30% höhere Kinaseaktivität konnte nach Behandlung der Zellen mit γ_3 -MSH festgestellt werden.

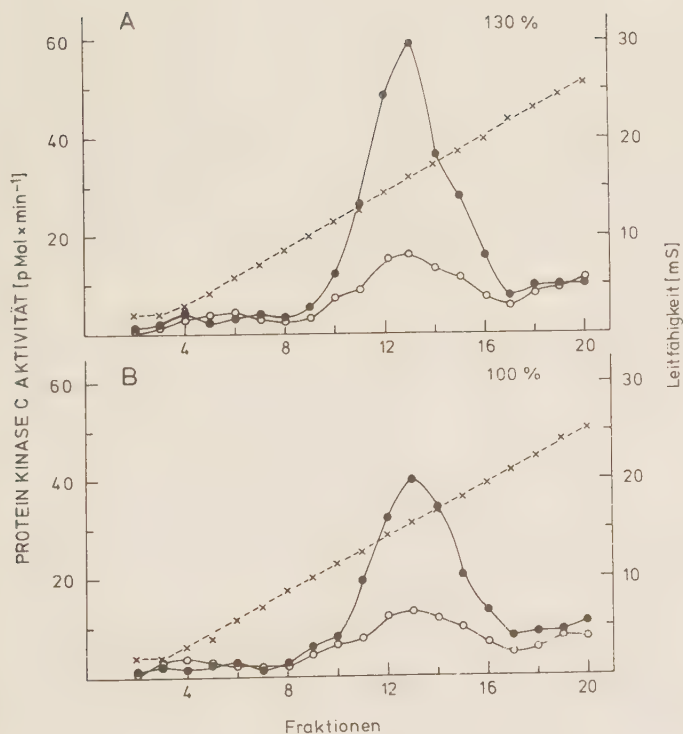


Abb. 49: DEAE-Cellulose-Chromatographie der Proteinkinase C von Kontroll-(B) und γ_3 -MSH-stimulierten (A)-Zellen

Von 100 µl Aliquots jeder Fraktion wurde in Gegenwart (● — ●) und Abwesenheit (o — o) von 0,5 mM CaCl₂ und 10 µg Phosphatidylserin die Proteinkinase C-Aktivität bestimmt.
x --- x: Leitfähigkeit.

5. DISKUSSION

Molekulare Vorgänge bei intrazellulären Regulationsmechanismen können nur durch die Verbindung von in vivo- und in vitro-Untersuchungen aufgeklärt werden. Dies gilt besonders für Vorgänge, in denen das auslösende Signal extrazellulär auftritt, wie z.B. bei allen durch Peptidhormone bewirkte Veränderungen zellulärer Stoffwechselleistungen. Einzelheiten komplexer Abläufe sowie Eigenschaften beteiligter Moleküle können meistens nur durch in vitro-Untersuchungen gewonnen werden. Die daraus abgeleiteten Reaktionssequenzen müssen dann in vivo bestätigt werden.

Daher setzt eine sinnvolle in vivo-Untersuchung des molekularen Regulationsmechanismus der CEH die Kenntnis von Eigenschaften dieses Enzyms voraus, die nur in vitro erhalten werden können.

5.1 In vitro-Charakterisierung der CEH

Ausgedehnte in vitro-Studien an 100 000xg und 20 000xg Überständen aus der Nebenniere der Ratte bzw. den Y-1 Zellen bildeten die Basis für in vivo-Untersuchungen zum Regulationsmechanismus der CEH. Während für das Enzym aus der Nebenniere der Ratte schon einige Ergebnisse von Pittman und Steinberg [91] vorlagen, hatte die CEH-Aktivität in Y-1 Zellen noch niemand nachgewiesen.

Methodische Schwierigkeiten beim Nachweis dieses Grenzphasen-enzym führten dazu, daß am Anfang dieser Studien Versuchsreihen zur Bestimmung der optimalen Testbedingungen durchgeführt wurden. Als Substrat wurde, wie bei den Versuchen von Pittman und Steinberg [91], Cholesterinoleat verwendet, das in einem BSA-enthaltenen Phosphat-Puffer suspendiert war (siehe 2.6.1.2).

Schwierigkeiten bereitete der Vergleich absoluter Enzymaktivitäten, die aus verschiedenen Versuchen gewonnen wurden. Nicht nur die Substrat-Charge, sondern auch das Alter des BSA-Substrates, die Lagerungstemperatur (siehe 3.2.3.1) und die Puffer-

bedingungen im Test (siehe 3.2.3.5) beeinflussten die Aktivitäten und die prozentuale Stimulierbarkeit des Enzyms. Die besten Ergebnisse wurden mit Substraten erzielt, die bei -20°C gelagert waren (siehe 3.2.3.1). Um eine möglichst hohe absolute Enzymaktivität zu erhalten, sollte der Test in 50 mM Tris-Puffer durchgeführt werden, Phosphat-Puffer verringerte die Aktivitäten, obwohl durch die Inhibierung der Proteinphosphatasen bessere Stimulierungsergebnisse resultierten (siehe 3.2.3.5 und 5.3). Diese Phänomene können wahrscheinlich durch eine variierende BSA-Substrat-Form erklärt werden, bei der das Cholesterinoleat an der Lipid-Wasserphase in eine für die CEH leichter oder schwerer zugängliche Form überführt wird, so daß die Katalyse unterschiedlich schnell erfolgt. Molekulare Vorstellungen über das BSA-Substrat und seine Veränderungen existieren nicht. Auch ist nicht bekannt, ob noch Hilfsenzyme, z.B. eine Coesterase, für die Katalyse benötigt werden.

Der auf einer Endprodukt-Bestimmung beruhende Test zeigte eine Linearität bis zu 1h Inkubation bei 37°C (siehe 3.2.1.2 und 4.2.2) und einer Proteinkonzentration von $750\text{ }\mu\text{g}$ (siehe 3.2.1.3) bzw. 1 mg/Testansatz (siehe 4.2.2). Für Routinebestimmungen wurde für das Rattensystem eine Testzeit von 30 min, für Y-1 Zellen, wegen der geringeren Menge des Ausgangsmaterials, von 60 min festgelegt.

Während die CEH aus der Nebenniere der Ratte im $100\text{ }\bar{\text{U}}$ untersucht wurde, konnte bei Y-1 Zellen nur $20\text{ }\bar{\text{U}}$ verwendet werden. Durch den Zellaufschluß im Dounce-Homogenisator (siehe 4.2.1) aggregierte das Enzym wahrscheinlich so sehr mit Lipiden, daß bei der $100\text{ }000\times\text{g}$ Zentrifugation die meiste Aktivität im Pellet sedimentierte, wohingegen bei der $20\text{ }000\times\text{g}$ Zentrifugation 50-70% der CEH-Aktivität im Überstand nachweisbar war (siehe 4.2.1). Auch das Sepharose CL-6B-Profil wies auf eine hohe Aggregation des Enzyms mit Lipiden hin. Während die CEH-Aktivität aus der Nebenniere der Ratte (siehe 3.2.4) [86] und des Rindes [98] in zwei Peaks (Peak I: $\text{MG} > 4 \times 10^6$, Peak II: $\text{MG } 2\text{-}5 \times 10^5$) eluierte, zeigte die Chromatographie eines $20\text{ }\bar{\text{U}}$ aus Y-1 Zellen an der gleichen Säule nur den, im Ausschlußvolumen eluierenden, Lipid-reichen Peak I (siehe 4.2.4).

Die CEH besitzt in ihrem katalytischen Zentrum einen Serinrest und ist somit durch DFP inhibierbar [98] bzw. kann durch [^3H]DFP markiert werden [86,98,99].

Diese radioaktive Markierung war für die Identifizierung des CEH-Polypeptids auf der SDS-PAGE eine wertvolle Hilfe. Nach Markierung verschiedener Fraktionen der Sephacryl S-300 Säule mit [^3H]DFP zeigte Peak II der CEH in dem auf der SDS-PAGE aufgetrennten Molekulargewichtsbereich nur eine [^3H]DFP-markierte Bande mit dem Molekulargewicht von 84 kDa, so daß im Rattensystem eine eindeutige Identifizierung dieses Polypeptids als katalytische Untereinheit der CEH erfolgen konnte (siehe 3.2.2).

Auch [^3H]DFP markierter 20 Ü aus Y-1 Zellen zeigte, neben einigen anderen radioaktiv markierten Banden, ein [^3H]DFP-markiertes Polypeptid mit dem Molekulargewicht von 84 kDa (siehe 4.2.6.2), so daß auch in diesem System, wie für die CEH aus der Nebenniere vom Rind [98,99] und Ratte [86] (siehe 3.2.2), die 84 kDa-Bande als Untereinheit der Esterase identifiziert zu sein scheint.

Auch hinsichtlich der Aktivierbarkeit des Enzyms durch Mg^{2+} , ATP und Mg^{2+} , ATP, cAMP konnten, abgesehen von der Variabilität der Ergebnisse beruhend auf der BSA-Substrat-Form, keine Unterschiede zwischen der CEH aus der Nebenniere der Ratte und den Y-1 Zellen beobachtet werden.

Auffallend war, daß im Vergleich zu Untersuchungen im 100 Ü aus der Nebennierenrinde des Rindes, bei denen Mg^{2+} -Zugabe eine Verminderung der CEH-Aktivität verursachte (nicht dargestellte Ergebnisse), im 100 Ü der Nebenniere der Ratte und im 20 Ü der Y-1 Zellen eine Aktivitätssteigerung der CEH durch Zugabe dieses Cofaktors verursacht wurde (siehe 3.2.3.2 und 4.2.5.1). Während die Aktivitätsverminderung durch eine Mg^{2+} -abhängige Aktivierung der Proteinphosphatasen zu erklären ist [94,95], konnte für die Erhöhung der Aktivität keine Erklärung gefunden werden, so daß für Aktivierungsstudien meistens der Mg^{2+} -Wert als Basis zur Berechnung der prozentualen CEH-Stimulierung diente.

Untersuchungen zur Abhängigkeit der Enzymaktivierung von den Cofaktorkonzentrationen ergaben für beide Systeme die gleichen

Ergebnisse. Optimale Stimulierungen wurden bei Zusatz von 5 mM Mg^{2+} , 0,1-1 mM ATP und 1-10 μ M cAMP erzielt (siehe 3.2.3.2). Auch der Proteingehalt im Aktivierungsansatz beeinflusste den Stimulierungsfaktor. Für das Enzym aus der Nebenniere der Ratte konnte bei 175 μ g Protein pro Ansatz die höchste Aktivierung beobachtet werden (siehe 3.2.3.3). Die Kinetik der Aktivierung gab Aufschluß über das relative Verhältnis zwischen Proteinkinase- zu Proteinphosphataseaktivität im Stimulierungsansatz. Die CEH aus der Nebenniere der Ratte zeigte zwischen 20 und 30 min Inkubation bei 37°C die höchste cAMP-abhängige Aktivierung (siehe 3.2.3.4), d.h. zu diesem Zeitpunkt wurde das Enzym relativ schneller phosphoryliert als dephosphoryliert. Übereinstimmend mit diesem Ergebnis wurde auch der höchste [32 P]Phosphateinbau in die 84 kDa-Bande nach 30 min Inkubation beobachtet (siehe 3.2.7.1). Bei Y-1 Zellen erhöhte sich der Aktivierungsfaktor mit der Inkubationszeit (siehe 4.2.5.1), wohingegen der [32 P]Phosphateinbau in die CEH-Bande ebenfalls nach 30 min sein Maximum erreichte (siehe 4.2.6.1).

Auch das ATP-Analogon, ATP- γ -S, war in der Lage, die CEH zu aktivieren (siehe 3.2.3.4 und 4.2.5.1) bzw. zu phosphorylieren (siehe 3.2.7). Im Gegensatz zu den Aktivierungsstudien an den Lipasen bzw. der CEH aus dem Fettgewebe des Hühnchens [115], in denen die mit ATP- γ -S aktivierten Enzyme eine größere Stabilität ihres Aktivierungszustandes zeigten, wurde in den hier untersuchten Systemen, abgesehen von einer generell geringeren Stimulierungsrate durch ATP- γ -S, kein Unterschied in der Kinetik von ATP- und ATP- γ -S-Aktivierung beobachtet.

Zum erstenmal konnte in dieser Arbeit die Darstellung einer aktivierten CEH-Form außerhalb des Enzymtests erbracht werden (siehe 3.2.6). Hierzu wurde zuerst die Aktivierung durchgeführt, dann die Aktivierungsfaktoren (Mg^{2+} , ATP, cAMP) abgetrennt und anschließend die CEH-Aktivität bestimmt. Die Gegenwart von Proteinphosphataseinhibitoren (Phosphat-Puffer) verhinderte die Inaktivierung des Enzyms, so daß auch nach einer Inkubationsdauer von 1 h 37°C eine erhöhte CEH-Aktivität nachweisbar war.

In Abwesenheit von Phosphat-Puffer wurde das Enzym schon durch den 10minütigen CEH-Test nach der Cofaktorabtrennung inaktiviert, erneute Zugabe der Cofaktoren führte aber zu einer reversiblen Aktivierung des Enzyms (siehe 3.2.6).

Diese Ergebnisse stellen einen wichtigen Schritt dar, um eindeutig zu zeigen, daß nicht Vorgänge am Substrat, sondern eine chemische Modifizierung des Enzymmoleküls der Grund für die Aktivierung ist.

Ähnliche Versuche sind bisher nur bekannt für die Hormon-sensitive Lipase aus dem Fettgewebe des Hühnchens [134,135], ein Enzym, das mit der Hormon-sensitiven CEH der Nebenniere identisch zu sein scheint [101].

5.2 Vergleich der beiden Zellsysteme: Suspendierte Zellen der Nebenniere der Ratte und Y-1 Zellen

Durch das Arbeiten mit isolierten Nebennierenzellen der Ratte konnte einerseits die komplexe Situation im Ganztier-System umgangen werden, andererseits zeigten die ermittelten Ergebnisse aber hinsichtlich der absoluten Steroidsekretion und der prozentualen Stimulierbarkeit der Zellen durch ACTH und db cAMP je nach Präparation eine große Variabilität, so daß es schwierig war, Daten aus unterschiedlichen Versuchen miteinander zu vergleichen.

Neben der durch Streßbedingungen variierenden ACTH-Sekretion im Ganztier, wodurch eine verschieden hohe Basalaktivität der Steroidogenese in isolierten Nebennierenzellen resultierte (siehe 3.1.4), könnten auch zwei bekannte in vitro-Effekte die Nicht-Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erklären:

Durch Proteaseeinwirkung bei der Zellpräparation waren die ACTH-Rezeptoren an der Zellmembranoberfläche möglicherweise so verändert, daß es beim Hormonstimulus zu keiner aussagefähigen Zellantwort kommen konnte. Es ist z.B. für den Insulinrezeptor im Fettgewebe der Ratte bekannt, daß Trypsin den Insulineffekt nachahmen kann, indem es eine Proteinkinase aktiviert, die eine Phosphorylierung des Rezeptors bewirkt [147].

Ähnliche Effekte könnten auch bei dem vorliegenden Zellsystem durch Kollagenaseeinwirkung entstanden sein. Auch die je nach Zellpräparation unterschiedlich ausgebildeten "gap-junction"-artigen Verbindungen zwischen den Zellen stellen eine weitere Erklärungsmöglichkeit dar [5]. In der Nebennierenrinde sind insbesondere in der Zona reticularis viele "gap-junctions" zwischen den Zellen nachweisbar [148], die wahrscheinlich den Transport intrazellulärer Mediatoren beschleunigen. Bei Zellsuspensionen werden diese Verbindungen durch Aneinanderhaften der Zellen nachgeahmt, wobei es von der jeweiligen Präparation abhängt, wie stark die Zellen assoziiert sind [5].

Wie von vielen anderen Autoren ermittelt [26,47,109], wurde auch bei den in dieser Arbeit isolierten Nebennierenzellen die maximale Steroidogeneserate bei ca. 34 pM ACTH und 0,5 mM db cAMP im Testansatz beobachtet (siehe 3.1.1). Interessant ist das Abknicken der Dosis-Wirkungs-Kurve (siehe 3.1.1) bei noch höheren Konzentrationen der beiden steroidogenen Substanzen. Da die verminderte Steroidsekretion auch bei db cAMP-Zugabe auftrat, kann dieses Phänomen weder durch eine Verminderung in der Anzahl der ACTH-Rezeptoren [149,150], noch durch eine Veränderung am Rezeptor-Adenylatcyclase-Komplex erklärt werden [150,151]. Kramer et al. [151] beobachteten eine verminderte Steroidogenese in Zellkulturen von Nebennierenzellen des Rindes nach langer Inkubation (36-48 h) mit ACTH und db cAMP und erklärten dieses Ergebnis mit einer Abnahme der Cholesterin "side-chain-cleavage"-Aktivität bei diesem Langzeitversuch.

Neben einer Verminderung der Steroidogenese durch Inhibierung der ACTH-Sekretion infolge eines erhöhten Corticosteroid-Spiegels im Ganztiersversuch [152], zeigten Carsia und Malamed [153] auch eine Abhängigkeit der Steroidogenese in isolierten Nebennierenzellen der Ratte von der Glucocorticoid-Konzentration im Medium. Der molekulare Mechanismus dieser Regulation ist jedoch unbekannt. Da auch eine Verminderung der cAMP-induzierten Steroidogenese durch Glucocorticoide beschrieben wird [154], kann ein Einfluß auf die ACTH-Rezeptoren und/oder Adenylatcyclase ausgeschlossen werden [153]. Die Autoren diskutierten

eine Induktion der 5 α -Reduktase durch die sezernierten Steroide, so daß inaktive Metabolite entstehen, die nicht im Fluoreszenztest nachweisbar sind [153].

Im Gegensatz zu db cAMP, dessen steroidogene Wirkung Ca²⁺-unabhängig ist, wurde die maximale Steroidogeneserate bei der ACTH-Stimulierung nur in Gegenwart von > 5 mM Ca²⁺ im Inkubationsansatz erzielt (siehe 3.1.3). Dieses Ergebnis bestätigt die Studien von Sayers [128] und Trzeciak und Mathé [109], die bis zu einer Ca²⁺-Konzentration von 7,65 mM eine kontinuierlich ansteigende Steroidsekretion in Gegenwart von ACTH beobachteten.

Widersprüchlich ist jedoch, daß zur Aktivierung der Adenylatcyclase eine sehr viel niedrigere Ca²⁺-Konzentration benötigt wird; die in Steroidogenese-Versuchen eingesetzte Ca²⁺-Menge führt in vitro zur Inhibierung der cAMP-Produktion [5,155]. Sayers [128] vermutete deshalb, daß die Adenylatcyclase in der intakten Plasmamembran so kompartimentiert ist, daß die effektive Ca²⁺-Konzentration in diesem Kompartiment sehr niedrig ist. Es ist aber auch bekannt, daß Mn²⁺ den inhibierenden Effekt von Ca²⁺ aufheben kann [156] und es so, durch das Zusammenspiel beider Ionen in vivo, zu einer Aktivitätssteigerung des Enzyms kommen könnte.

Es sei an dieser Stelle auch noch erwähnt, daß versucht wurde, die Steroidogenese durch Acetylcholin (10^{-3} - 10^{-8} M) zu stimulieren. Im Gegensatz zu Zellsuspensionen von der Nebenniere des Rindes [157,158] konnte jedoch keine cholinerge muskarinartige Stimulation nachgewiesen werden.

Die relativ geringe Zellausbeute bei der Herstellung der Zellsuspensionen aus der Nebenniere der Ratte machte es nötig, nach einem System zu suchen, in dem die Nebennierenzellen in Zellkultur gehalten und somit beliebig oft vermehrt werden konnten. Tumorzellen der Nebenniere der Maus (Y-1 Zellen) waren ein schon lange bewährtes Modell zur Untersuchung der Steroidogenese [39-44], so daß dieses System etabliert wurde. Nicht nur die Züchtung großer Zellmassen und das Umgehen von Tierversuchen favorisierten dieses Zellsystem, sondern auch die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, selbst in Langzeitversuchen.

Nebennierenzellen in der Zellkultur haben allerdings ihre Differenzierung zwischen Zona reticularis- und Zona fasciculata-Zellen verloren [5]. Auch als Steroidprodukte werden nicht Cortisol und Corticosteron ausgeschieden, sondern das für Y-1 Zellen spezifische 20α -Hydroxyprogesteron und 11β - 20α -Dihydroprogesteron (siehe 4.1).

Auffallend gegenüber dem Rattensystem ist, daß ACTH und db cAMP nur eine etwa 5- bis 10fache Stimulierung der Steroidsekretion gegenüber der Basalaktivität verursachten (siehe 4.1.2), auch konnte diese Stimulierungsrate nicht durch Zufuhr exogenen Cholesterins mittels LDL gesteigert werden (siehe 4.1.2), so daß dieses Phänomen nicht auf einen Mangel an Cholesterin, dem Ausgangsprodukt der Steroidhormon-Biosynthese, zurückzuführen ist. Die Dosis-Wirkungs-Kurven von ACTH und db cAMP waren im Vergleich zum Rattensystem zu höheren Konzentrationen der steroidogenen Substanzen verschoben. Maximale Steroidsekretion wurde ab 85 pM ACTH bzw. $2,5 \text{ mM}$ db cAMP erzielt, ein Abknicken der Kurven wurde auch bei höheren Konzentrationen nicht beobachtet (siehe 4.1.1).

Obwohl Kowal [136] bei Zusatz von $0-10 \text{ mM Ca}^{2+}$ zum Inkubationsansatz keinen Einfluß auf die ACTH-induzierte Steroidogenese beobachtete, zeigten die hier dargelegten Studien die gleiche Ca^{2+} -Abhängigkeit der ACTH-Wirkung wie bei dem zuerst untersuchten Zellsystem.

5.3 Regulation der CEH: Biologische Stimuli und Mediatoren der Informationsübertragung

Die Rolle von cAMP als "second messenger" in der ACTH-induzierten Steroidogenese gilt durch viele in vivo- und in vitro-Studien als bewiesen [14,33,53], auch eine cAMP-abhängige Regulation der CEH konnte in vitro durch Aktivierungs- und Phosphorylierungsversuche gezeigt werden [91-96], so daß eine cAMP-abhängige chemische Modifizierung des CEH-Moleküls wahrscheinlich ist. Diese hauptsächlich an der CEH aus der Nebenniere des Rindes durchgeführten Untersuchungen wurden durch die in vitro-

Studien am 100 Ü aus der Nebenniere der Ratte und am 20 Ü aus den Y-1 Zellen in dieser Arbeit bestätigt und weiter ausgeführt.

Zugabe von Mg^{2+} , ATP und cAMP führte in den beiden untersuchten Systemen zu einer Aktivitätssteigerung der CEH um ca. 200-300% (siehe 3.2.3 und 4.2.5), korrelierbar war dieses Ergebnis mit dem vermehrten Einbau von [^{32}P]Phosphat in die 84 kDa-Bande auf der SDS-PAGE (siehe 3.2.7.1 und 4.2.6.1), so daß auch diese Versuche die Annahme, daß das CEH-Molekül mittels einer cAMP-abhängigen Proteinkinase chemisch modifiziert wird, unterstützen. Gegenüber den Versuchen aus dem Rindersystem [94,95] ist in diesen Versuchen die besonders hohe Aktivierungsrate der CEH nach Cofaktorzugabe hervorzuheben, die bisher nur bei der Hormon-sensitiven Lipase aus dem Fettgewebe des Hühnchens erzielt wurde [115,134,135].

Zugabe von Inhibitor der cAMP-abhängigen Proteinkinase zum Inkubationsansatz verhinderte dagegen jegliche cAMP-abhängige Aktivierung der CEH (siehe 3.2.3.6). Auch die Abtrennung der katalytischen Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase durch Chromatographie an Phosphocellulose P-11 führte zu einem Verlust der Aktivierbarkeit des Enzyms (siehe 3.2.3.7). Eine Beteiligung der Caseinkinasen, die ebenfalls an P-11 binden [159], konnte durch eine Modifizierung des Versuchs ausgeschlossen werden (nicht gezeigte Daten). Zugabe von exogener katalytischer Untereinheit zum P-11-Durchlauf führte wieder zu einer Aktivierung (siehe 3.2.3.7 und 4.2.5.3) und Phosphorylierung (siehe 3.2.7.3) des Enzyms, so daß die Aktivierung der CEH durch Phosphorylierung mittels der cAMP-abhängigen Proteinkinase [91-96] auch durch diese Studien bestätigt wird.

Die postulierte Dephosphorylierung bzw. Inaktivierung der CEH durch Phosphoproteinphosphatasen [94,95] war bisher in keiner Spezies systematisch untersucht worden. Eine zeitabhängige Dephosphorylierung der 84 kDa-Bande konnte sowohl für das Enzym aus der Nebenniere der Ratte (siehe 3.2.7.2) als auch für das der Y-1 Zellen (siehe 4.2.6.2) wahrscheinlich gemacht werden. Die Verhinderung des [^{32}P]Phosphateinbaus durch Zugabe von Phosphoproteinphosphatase-Inhibitoren unterstützt diese

Schlußfolgerung (siehe 3.2.7.2). Aktivierungsstudien in Gegenwart dieser Inhibitoren erhöhten die prozentuale Stimulierbarkeit der CEH (siehe 3.2.3.5 und 4.2.5.2), was auch einen indirekten Hinweis für die Beteiligung von Proteinphosphatasen an der CEH-Regulation gibt. Auch die reversible Aktivierung der CEH im 100 Ü der Ratte (siehe 3.2.6) ist mit diesen Vorstellungen vereinbar.

Zugabe des Phosphatase-Pools einer Sepharose CL-6B Säule zu Esterasefraktionen verursachte eine Verminderung der CEH-Aktivität (siehe 3.2.2), die z.T. durch Verwendung eines Phosphat-Puffers verhindert werden konnte (siehe 3.2.2).

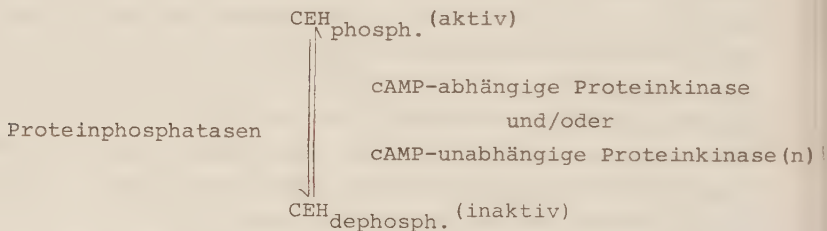
Diese Ergebnisse weisen letztendlich darauf hin, daß in vitro das CEH-Molekül phosphoryliert und dephosphoryliert wird; es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß in vivo auch noch andere Proteine, wie z.B. das "sterol carrier protein", chemisch modifiziert werden und so zur Regulation der Cholesterinbereitstellung beitragen.

Welche Proteinphosphatasen die Dephosphorylierung der CEH und ggf. anderen beteiligter Enzyme katalysieren, ist unbekannt.

An der Phosphorylierung des CEH-Moleküls ist die cAMP-abhängige Proteinkinase beteiligt. Dies schließt jedoch nicht aus, daß die CEH auch durch andere Kinasen in einer Art "multisite phosphorylation", wie es für die Glykogensynthetase bekannt ist [102], phosphoryliert werden kann.

Für eine cAMP-unabhängige Phosphorylierung der CEH spricht die signifikant höhere CEH-Aktivität nach Zugabe von Mg^{2+} und ATP, ohne Anwesenheit von cAMP, bei allen Aktivierungsversuchen (siehe 3.2.3 und 4.2.5). Unter der Annahme, daß keine in katalytische Untereinheit dissoziierte cAMP-abhängige Proteinkinase im Aktivierungsansatz vorlag und auch keine Veränderung des Substrats durch Mg^{2+} , ATP verursacht wurde (gezeigt in Kontrollversuchen mit anderen Nukleotiden wie AMP, ADP durch Eiteljörge und Kunau), ist die Beteiligung einer oder mehrerer cAMP-unabhängiger Proteinkinasen am wahrscheinlichsten. In Übereinstimmung mit dieser Annahme steht auch der [^{32}P]Phosphateinbau in die 84 kDa-Bande, wenn die Inkubation nur in Gegenwart von Mg^{2+} und [γ - ^{32}P]ATP stattfand (siehe 3.2.7).

Aus diesen in vitro-Versuchen ergibt sich somit folgende Modellvorstellung für die chemische Modifizierung des CEH-Moleküls:



Diese durch in vitro-Versuche gewonnene Vorstellung über einen möglichen Regulationsmechanismus der CEH bedurfte der Bestätigung durch in vivo-Untersuchungen und ließ außerdem eine Reihe von Fragen offen: Ist in vivo cAMP der einzige Regulator der CEH-Aktivität und/oder existieren noch andere Mediatoren? Durch welche hormonellen Stimuli werden diese Mediatoren freigesetzt, und wie sieht ihr molekularer Mechanismus der CEH-Aktivierung in vivo aus?

Y-1 Zellen, die schon bei vielen Steroidogenese-Untersuchungen ein brauchbares Zellsystem darstellten [39-44], erwiesen sich auch bei diesen Versuchen als ein exzellentes Modell zur Aufklärung der erläuterten Problematik.

An ihnen konnte in dieser Arbeit zum erstenmal die hormonelle Aktivierung der CEH in einem Zellsystem nachgewiesen werden.

Neben dem bekannten Stimulator der Steroidogenese, ACTH [9-16], war auch γ_3 -MSH, ein anderes Hypophysenhormon [22,23], in der Lage, die CEH zu aktivieren (siehe 4.3). Die physiologische Bedeutung dieser Aktivierung wurde aber erst durch den Nachweis eines vermehrten intrazellulären Cholesterinesterabbaus nach Einwirkung dieser beiden Hormone erbracht (siehe 4.1.6).

Pedersen und Brownie zeigten dagegen an hypophysectomierten Ratten eine Aktivierung der CEH-Aktivität nur nach γ_3 -MSH-Gabe, ACTH hatte keinen Einfluß auf die Enzymaktivität [19,20,104]. Im Gegensatz zu den hier dargelegten Versuchen, basieren ihre Ergebnisse auf Studien am komplexen Ganztiersystem, was

vielleicht eine Erklärungsmöglichkeit für die unterschiedlichen Befunde liefern könnte.

Auf der Suche nach den Komponenten der Informationsübertragung wurde die Rolle von cAMP als ein Mediator des ACTH-Stimulus auch in vivo bestätigt. Die Tatsache, daß db cAMP einen vermehrten Cholesterinesterabbau (siehe 4.1.6) und eine Stimulierung der CEH-Aktivität verursachte (siehe 4.3), spricht für eine cAMP-abhängige Aktivierung der CEH und macht daher indirekt eine cAMP-abhängige Phosphorylierung des Enzyms wahrscheinlich. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß auch andere funktionell wichtige Proteine, wie z.B. das "sterol carrier protein", phosphoryliert werden.

Da γ_3 -MSH keine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels bewirken soll [18], muß bei diesem Informationstransfer ein anderer Mediator beteiligt sein.

Eine sehr interessante Möglichkeit, die CEH zu aktivieren, stellt in diesem Zusammenhang die Phosphorylierung der CEH durch die Ca^{2+} - und Phospholipid-abhängige Proteinkinase (C-Kinase) dar. In vivo wurde diese Annahme durch Versuche mit dem Proteinkinase C-aktivierenden Phorbol ester, TPA [143], verstärkt. TPA erhöhte nicht nur geringfügig die Steroidsekretion (siehe 4.1.6), sondern der Phorbol ester war auch in der Lage, die CEH zu aktivieren (siehe 4.3) und den intrazellulären Cholesterinesterabbau zu beschleunigen (siehe 4.1.6).

Eine ähnliche stimulierende Wirkung von TPA auf die Sekretion von Hormonen ist auch aus anderen Systemen bekannt, so wird sowohl für die Insulin- [160] als auch für die Aldosteron-Sekretion [161] ein C-Kinase-abhängiger Mechanismus diskutiert. PA, ein Phorbol ester, der die C-Kinase-Aktivität nicht beeinflusst [146], hatte auch keinen Einfluß auf die CEH-Aktivität (siehe 4.3).

Das Vorkommen von C-Kinase in steroidogenen Geweben war für die Nebennierenzellen des Rindes [162] und für das Nebennierengewebe der Ratte [163] vor kurzem gezeigt worden und konnte in diesen Studien auch für Y-1 Zellen nachgewiesen werden (siehe 4.4). Weiterhin wurde die mögliche Beteiligung der C-Kinase an der Steroidogenese durch Inhibierung des Cholesterin-

esterabbaus (siehe 4.1.6) und der Steroidsekretion (siehe 3.1.5 und 4.1.3) durch TFP, einem Inhibitor der Ca^{2+} /Phospholipid-abhängigen Proteinkinase [130], verstärkt. Allerdings konnte in vitro auch eine Inhibierung der CEH durch TFP nachgewiesen werden (siehe 3.2.5 und 4.2.3), so daß möglicherweise die Inhibierung des Abbaus der endogenen Cholesterinester auch auf dieser Basis erklärt werden könnte.

Die Erhöhung der C-Kinase-Aktivität nach kurzzeitiger γ_3 -MSH-Stimulierung (siehe 4.4) ist der erste experimentelle Hinweis in einem Nebennierenrinden-System, daß die C-Kinase der Mediator bei der γ_3 -MSH-Wirkung sein könnte. Die widersprüchlichen Ergebnisse von Farese et al. [18], die keine Veränderungen im Phosphatidylinositol-Spiegel durch γ_3 -MSH beobachteten, sind wahrscheinlich durch die lange Versuchsdauer (2h) zu erklären, denn die Aktivierung der C-Kinase durch Diacylglycerin verlangt eine schnelle Änderung im Phosphatidylinositol-Spiegel der Zellen [164].

Weitere Hinweise auf eine mögliche Beteiligung der C-Kinase an der Steroidogenese geben die Studien von Vilgrain et al. [162]. Die Autoren beobachteten nach ACTH-Stimulierung eine Aktivitätserhöhung der C-Kinase-Aktivität in Suspensionen von Zona fasciculata-reticularis-Zellen. Neben cAMP könnte die C-Kinase der oft postulierte zweite Mediator der ACTH-Wirkung sein.

Ob höhere Dosen an ACTH über γ_3 -MSH-Rezeptoren wirken oder ob sogar die zweite ACTH-Rezeptorklasse, die keine Veränderungen im cAMP-Spiegel bewirkt [51,52], mit den γ_3 -MSH-Rezeptoren identisch ist, ist unbekannt. Da γ_3 -MSH mit dem ersten Teil des ACTH-Moleküls (α -MSH) identische Aminosäuresequenzen aufweist [165] (Abb. 50), wäre eine gleiche Bindungsstelle nicht auszuschließen. In Übereinstimmung mit der Mediatorwirkung der C-Kinase stehen auch die Veränderungen im Phosphatidylinositol-Turnover in der Nebenniere nach ACTH-Stimulus [166]. Auch die in den in vitro-Studien bestimmte cAMP-unabhängige Aktivierung der CEH spricht für einen zweiten Mediator (siehe 3.2.3.2).

Die unterschiedlichen Kinetiken der ACTH- und db cAMP-induzierten Steroidogenese weisen ebenfalls auf mindestens einen weiteren "second messenger" beim ACTH-Stimulus hin (siehe 4.1.6).

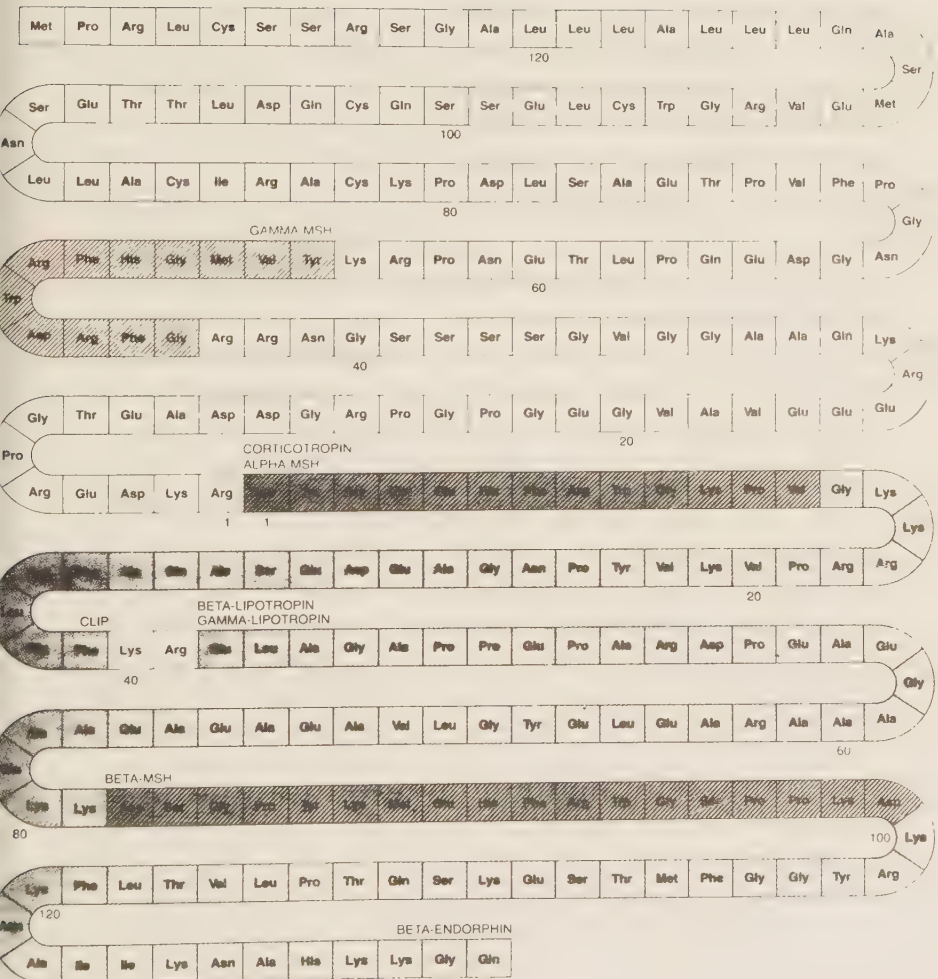


Abb. 50: Aminosäuresequenz des Pro-Opiomelanocortins [165]

Die ACTH-induzierte Steroidogenese zeigte einen schnelleren Anstieg in der Steroidsekretion als die durch db cAMP induzierte, so daß außer cAMP noch ein weiterer Mediator beim ACTH-Stimulus beteiligt sein könnte.

In vivo scheint das Zusammenspiel von γ_3 -MSH und ACTH für eine maximale Steroidogenese verantwortlich zu sein, denn γ_3 -MSH allein bewirkte keine Steroidsekretion (siehe 4.1.6), die synergistische Wirkung mit ACTH führte aber zu einer Potenzierung der Steroidogenese (siehe 4.1.5) [18]. Von daher scheint eine Aktivierung der CEH durch beide Mediatoren der Steroidogenese physiologisch sinnvoll.

Für die Beteiligung anderer Mediatoren an der Steroidogenese konnten keine eindeutigen Hinweise erbracht werden. Eine Aktivierung der CEH durch cGMP, einem anderen diskutierten Mediator der Steroidogenese [11,48,49], konnte in diesen Studien nicht bestätigt werden, denn weder die Steroidsekretion noch der Cholesterinesterabbau waren durch dieses cyclische Nukleotid beeinflussbar (siehe 4.1.6). Prostaglandine (PGE_2) konnten, wie für die Nebenniere der Ratte beschrieben [62,90], den Cholesterinesterabbau geringfügig beschleunigen, doch keine erhöhte Steroidsekretion verursachen (siehe 4.1.6). Inhibitoren der Prostaglandin-Synthese hatten dagegen bei einer kritischen Konzentration von 30 μM eine steroidogene Wirkung bei Y-1 Zellen (siehe 4.1.4) und zeigten einen stark synergistischen Effekt mit db cAMP hinsichtlich der Steroidsekretion (siehe 4.1.4). Neben dem Einfluß auf die Prostaglandin-Synthese [140] konnte für Indomethazin auch ein Eingreifen in den Phosphatidylinositol-Turnover nachgewiesen werden [167], in dem es die Diacylglycerin-Lipase hemmt [167], so daß die steroidogene Wirkung von Indomethazin bei Y-1 Zellen auch auf Veränderungen im Phosphatidylinositol-Spiegel zurückzuführen sein könnte.

Zusammenfassend lassen sich die Ergebnisse dieser Arbeit, wie in Abb. 51 gezeigt, darstellen:

Sowohl ACTH als auch γ_3 -MSH sind in der Lage, die CEH zu aktivieren, wobei die C-Kinase als ein möglicher "second messenger"

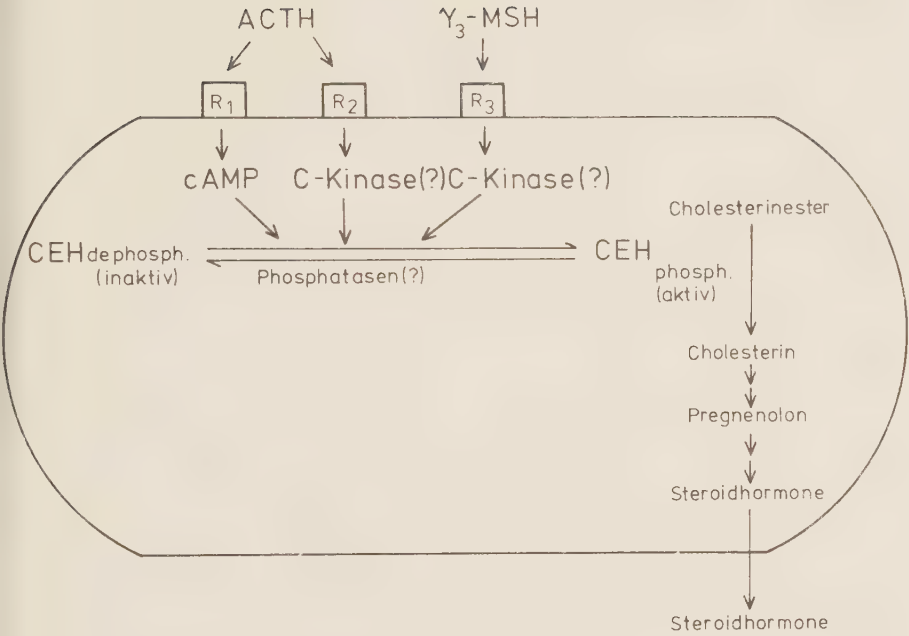


Abb. 51: In vivo-Regulation der CEH: mögliche Reaktionsfolge

der γ_3 -MSH-Wirkung anzusehen ist, und auch beim ACTH-Stimulus scheint neben der cAMP-abhängigen Proteinkinase, die C-Kinase an der Regulation der CEH beteiligt zu sein. Ob die γ_3 -MSH-Bindungsstellen mit dem cAMP-unabhängigen ACTH-Rezeptor identisch sind, ist unbekannt.

Die völlige Aufklärung des molekularen Regulationsmechanismus der CEH ist nur durch weitere gezielte in vivo- und in vitro-Versuche möglich. Das nächste Ziel in den in vitro-Studien müßte deshalb sein, eine CEH-Fraktion zu präparieren, die frei ist von jeglichen Proteinkinasen und -phosphatasen, so daß durch Zusatz von gereinigten exogenen Enzymen zu der Esterasefraktion die Aktivierung bzw. Phosphorylierung der CEH genauer untersucht werden kann.

Unter in vivo-Bedingungen fehlt letztendlich immer noch der Nachweis einer chemischen Modifizierung des CEH-Moleküls nach Hormoneinwirkung. Durch die limitierte Auflösung der eindimensionalen Gelelektrophorese konnte bisher kein vermehrter [^{32}P]Phosphateinbau in die 84 kDa-Bande nach Stimulierung der Zellen mit ACTH und γ_3 -MSH nachgewiesen werden. Durch zweidimensionale Techniken sollte dieser Nachweis aber möglich werden, so daß das System der Y-1 Zellen sicherlich noch viele Möglichkeiten zur Untersuchung des molekularen Regulationsmechanismus der CEH-Aktivierung bietet.

6. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Hormon-sensitive Cholesterinester-Hydrolase wurde zum erstenmal in Y-1 Zellen nachgewiesen. Als Untereinheit des Enzyms konnte, wie für die CEH aus der Nebenniere der Ratte, ein Polypeptid mit dem Molekulargewicht 84 kDa durch [³H]DFP-Markierung und SDS-PAGE identifiziert werden.
2. Die CEH aus der Nebenniere der Ratte und der Y-1 Zellen konnte in vitro aktiviert werden. Folgende Ergebnisse machen eine Phosphorylierung/Dephosphorylierung des Enzymmoleküls als Mechanismus der Aktivierung wahrscheinlich:
 - Zugabe von Mg^{2+} , ATP und Mg^{2+} , ATP, cAMP führten zu einer Aktivitätssteigerung um ca. 100% bzw. 200-300%.
 - Diese Enzymaktivierung konnte durch Zugabe von Phosphataseinhibitoren erhöht werden.
 - Der Inhibitor der cAMP-abhängigen Proteinkinase verhinderte eine cAMP-abhängige Aktivierung.
 - Die Aktivierung der CEH konnte mit [³²P]Phosphateinbau in die 84 kDa-Bande korreliert werden. Außerdem konnte eine zeitabhängige Dephosphorylierung der Bande gezeigt werden.
 - Nach Abtrennung der katalytischen Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase konnte weder eine Aktivierung noch eine Phosphorylierung der CEH nachgewiesen werden. Exogen zugesetzte katalytische Untereinheit führte zur Wiederherstellung der Stimulierbarkeit.
3. Neben dem Nachweis einer reversiblen Aktivierung bzw. Inaktivierung der CEH im Enzymtest wurde eine stabile aktivierte CEH-Form präparativ dargestellt.
4. Es gelang zum erstenmal, in einem intakten Zellsystem (Y-1 Zellen) die hormonelle Aktivierung der CEH zu zeigen. Nicht nur die Hypophysenhormone, ACTH und γ_3 -MSH, sondern auch db cAMP und TPA führten zu einer signifikant höheren Enzymaktivität.

5. Die physiologische Bedeutung dieser in vivo-Enzymaktivierung wurde durch einen gleichzeitigen Abbau der intrazellulären Cholesterinester durch die gleichen Substanzen erhärtet.
6. Nicht alle Substanzen, die zu einer Erhöhung der CEH-Aktivität führten, steigerten auch die Steroidogenese (vermehrte Steroidsekretion).
7. Der Effekt des Phorbolesters TPA auf die CEH-Aktivität sowie die Erhöhung der C-Kinase-Aktivität durch γ_3 -MSH führten zur Diskussion von C-Kinase als zweiten Mediator, neben cAMP, bei der Aktivierung der CEH.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Mulrow, P.J. (1979)
The Adrenals. In: Physiology and Biophysics III
224-247, Verlag: W.B. Saunders Comp.
- [2] James, V.H.T. (1979)
The Adrenal Gland, Raven Press, New York
- [3] Deane, H.W. (1962)
The anatomy, chemistry and physiology of adreno-
cortical tissue. In: Handbuch der experimentellen Pharma-
kologie, Vol. 14, Teil 1, 1-185, Springer Verlag, Berlin,
Göttingen und Heidelberg
- [4] Symington, T. (1969)
The adrenal cortex. In: Functional Pathology of the Human
Adrenal Gland, 3-216, Livingstone, Edinburgh und London
- [5] Tait, J.F., Tait, S.A.S. and Bell, J.B.G. (1980)
Steroid Hormone Production by Mammalian Adrenocortical
Dispersed Cells. In: Essays in Biochemistry (Campbell,
P.N., ed.), Vol. 16, 99-175
- [6] Davis, J.O. (1975)
The regulation of aldosterone secretion. In: The adrenal
cortex (Eisenstein, A.E., ed.), 77-94
Little Brown and Co., Boston
- [7] Mulrow, P.J. and Goffinet, J.A. (1969)
Renin-angiotensin system. In: Physiology of the human
kidney (Wesson, L., ed.), Grune and Stratton, New York
- [8] Catt, K.J. and Aguilera, G. (1980)
Angiotensin II receptors. In: Cellular receptors for
hormones and neurotransmitters (Schulster, D. and
Levitzki, A., eds.), 233-251, John Wiley and Sons Ltd,
London
- [9] Halkerston, J.D.K. (1975)
Adv. Cyclic Nucleotide Res. 6, 99-136
- [10] Sharma, R. and Sawhney, R.S. (1978)
Biochemistry 17, 316-321

- [11] Sharma, R., Ahmed, N.K. and Shanker, G. (1976)
Eur. J. Biochem. 70, 427-433
- [12] Koritz, S.B. and Kumar, A.M. (1970)
J. Biol. Chem. 245, 152-159
- [13] Garren, L.D., Ney, R.L. and Warren, W.D. (1965)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 53, 1443-1450
- [14] Grahamé-Smith, D.G., Butcher, R.W., Ney, R.L. and
Sutherland, E.W. (1967)
J. Biol. Chem. 242, 5535-5541
- [15] Seelig, S. and Sayers, G. (1973)
Arch. Biochem. Biophys. 154, 230-239
- [16] Haynes, R.C., Jr. (1975)
Theories on the mode of action of ACTH in stimulating
secretory activity of the adrenal cortex. In: Handbook
of Physiology (Greep, R.O., Astwood, E.B., eds.),
Sect. 7, Vol VI, 69-76, American Physiological Society,
Washington
- [17] Al-Dujaili, E.A.S., Hope, J., Estivariz, F.E., Lowry,
P.J. and Edwards, C.R.W. (1981)
Nature 291, 156-159
- [18] Farese, R.V., Ling, N.C., Sabir, M.A., Larson, R.E.
and Trudeau III, W.L. (1983)
Endocrinology 112, 129-132
- [19] Pedersen, R.C. and Brownie, A.C. (1980)
Science 208, 1044-1046
- [20] Sharp, B. and Sowers, J.R. (1983)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 110, 357-361
- [21] Pedersen, R.C. and Brownie, A.C. (1980)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 2239-2243
- [22] Nakanishi, S., Inoue, A., Kita, T., Nakamura, M.,
Chang, A.C.Y., Cohen, S.N. and Numa, S. (1979)
Nature 278, 423-427
- [23] Herbert, E. (1981)
Trends Biochem. Sci. 6, 184-188

- [24] Schwyzer, R. (1977)
Ann. N. Y. Acad. Sci. 297, 3-26
- [25] Schulster, D. and Schwyzer, R. (1980)
ACTH receptors. In: Cellular receptors for hormones and neurotransmitters (Schulster, D. and Levitzki, A., eds.), 197-217, John Wiley and Sons Ltd., London
- [26] Schwyzer, R., Schiller, P., Seelig, S. and Sayers, G. (1971)
FEBS Lett. 19, 229-231
- [27] Schulster, D., Burstein, S. and Cook, B.A. (1976)
Molecular Endocrinology of the Steroid Hormones , Chapter 11, 167-207, John Wiley and Sons, London und New York
- [28] Buonassisi, V., Sato, G. and Cohen, A.I. (1962)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48, 1184-1190
- [29] Schimmer, B.P., Ueda, K. and Sato, G.H. (1968)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 32, 806-810
- [30] Slinger, R.C.L. and Civen, M. (1971)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 993-999
- [31] Finn, F.M., Widnell, C.C. and Hofmann, K. (1972)
J. Biol. Chem. 247, 5695-5702
- [32] Lefkowitz, R.J., Roth, J., Pricer, W. and Pastan, I. (1970)
Proc. Natl. Acad. Sci. 65, 745-752
- [33] Haynes, R.C., Jr. (1958)
J. Biol. Chem. 233, 1220-1222
- [34] Haynes, R.C., Jr., Koritz, S.B. and Peron, F.G. (1959)
J. Biol. Chem. 234, 1421-1423
- [35] Bär, H.P. and Hechter, O. (1969)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 35, 681-686
- [36] Mahaffee, D.D. and Ontjes, D.A. (1980)
J. Biol. Chem. 255, 1565-1571
- [37] Richardson, M. and Schulster, D. (1973)
Biochem. J. 136, 993-998
- [38] Saez, J.M., Evain, D. and Gallet, D. (1978)
J. Cyclic Nucleotide Res. 4 : 311-321

- [39] Doherty, P.J., Tsao, J., Schimmer, B.P., c.Mumby, M.
and Beavo, J.A. (1982)
J. Biol. Chem. 257, 5877-5883
- [40] Masui, H., Reid, L.M. and Glans, C. (1978)
Exp. Cell. Res. 117, 219-230
- [41] Schimmer, B.P., Tsao, J. and Knapp, M. (1977)
Mol. Cell. Endocrinology 8, 135-145
- [42] Gutman, N.S., Rae, P.A. and Schimmer, B.P. (1978)
J. Cell. Phys. 97, 451-460
- [43] Schimmer, B.P. (1972)
J. Biol. Chem. 247, 3134-3138
- [44] Rae, P.A., Gutman, N.S., Tsao, J. and Schimmer, B.P. (1979)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1896-1900
- [45] Williams, S.A. and Schimmer, B.P. (1983)
J. Biol. Chem. 258, 10215-10218
- [46] Beall, R.J. and Sayers, G. (1972)
Arch. Biochem. Biophys. 148, 70-76
- [47] Mackie, C., Richardson, M.C. and Schulster, D. (1972)
FEBS Lett. 23, 345-348
- [48] Ahrens, H., Aranjaniyil, K.P., Kuroda, Y. and Sharma, R.K.
(1982)
Arch. Biochem. Biophys. 215, 597-609
- [49] Ponnal, N., Aiyar, N.V. and Sharma, R.K. (1982)
Arch. Biochem. Biophys. 217, 638-646
- [50] Moyle, W.R., Kong, Y.C. and Ramachandran, J. (1973)
J. Biol. Chem. 258, 2409-2417
- [51] Bristow, A.F., Gleed, C., Fauchère, J.-L., Schwyzer, R.
and Schulster, D. (1980)
Biochem. J. 186, 599-603
- [52] Salmon, D.M., Fatih, S. and Schulster, D. (1980)
Biochemical Society Bulletin, London Meeting 15-17,
Vol. 2, No. 4
- [53] Podesta, E., Milani, A., Steffen, H. and Neher, R. (1979)
Biochem. J. 180, 355-363

- [54] Sala, G.B., Hayashi, K., Catt, K.J. and Duffau, M.L. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 3861-3865
- [55] Neher, R. and Milani, A. (1976)
Clin. Endocrinology 5, 29s-39s
- [56] Podesta, E.J., Milani, A., Steffen, H. and Neher, R. (1980)
Biochem. J. 186, 391-397
- [57] Laychock, S.G. and Rubin, R.P. (1977)
J. Steroid Biochem. 8, 663-667
- [58] Laychock, S.G., Warner, W. and Rubin, R.P. (1977)
Endocrinology 100, 74-81
- [59] Laychock, S.G. and Rubin, R.P. (1975)
Prostaglandins 10, 529-540
- [60] Warner, W. and Rubin, R.P. (1975)
Prostaglandins 9, 83-95
- [61] Rolland, P.H., Rolland, A.M., Benkoel, L. and Toga, M. (1981)
Mol. Cell. Endocrinology 22, 179-193
- [62] Matsuoka, H., Tan, S.Y. and Mulrow, P.J. (1980)
Prostaglandins 19, 291-298
- [63] Laychock, S.G., Franson, R.C., Weglick, W.B. and
Rubin, R.P. (1977)
Biochem. J. 164, 753-756
- [64] Rubin, R.P. and Laychock, S.G. (1978)
Ann. N. Y. Acad. Sci. 298, 377-390
- [65] Farese, R.V. (1983)
J. Steroid Biochem. 19, 1029-1032
- [66] Farese, R.V. (1981)
Biochemistry 20, 6047-6051
- [67] Farese, R.V., Sabir, A.M., Vandor, S.L. and
Larson, R.E. (1980)
J. Biol. Chem. 255, 5728-5734
- [68] Farese, R.V., Sabir, A.M. and Larson, R.E. (1980)
J. Biol. Chem. 255, 7232-7237
- [69] London, E.J. and Greenberg, D.M. (1954)
J. Biol. Chem. 209, 493-498

- [70] Brown, M.S., Kovanen, P.T. and Goldstein, J.L. (1979)
Rec. Prog. Horm. Res. 35, 215-257
- [71] Trzeciak, W.H. and Boyd, G.S. (1973)
Eur. J. Biochem. 37, 327-332
- [72] Vahouny, G.V., Chanderbhan, R., Noland, B.J., Irwin, D.,
Dennis, P., Lambeth, J.D. and Scallen, T.J. (1983)
J. Biol. Chem. 258, 11731-11737
- [73] Ontjes, D.A. (1980)
Life Sciences 26, 2023-2035
- [74] Simpson, E.R., McCarthy, J.L. and Peterson, J.A. (1978)
J. Biol. Chem. 253, 3135-3139
- [75] Karaboyas, G.S. and Koritz, S.B. (1965)
Biochemistry 4, 426-468
- [76] Kowluru, R.A., Rajan, G. and Jefcoate, C.R. (1983)
J. Biol. Chem. 258, 8053-8059
- [77] Garren, L.D., Gill, G.M., Masui, H. and Walton, G.N. (1971)
Rec. Prog. Horm. Res. 24, 433-478
- [78] Pedersen, R.C. and Brownie, A.C. (1983)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1882-1886
- [79] Rubin, R.P., Sheid, B., McCauley, R. and Laychock, S.G.
(1974)
Endocrinology 95, 370-378
- [80] Jaanus, S.D., Rosenstein, M.J. and Rubin, R.P. (1970)
J. Physiol. 209, 539-556
- [81] Gidez, L.I. and Feller, E. (1969)
J. Lipid Res. 10, 285-295
- [82] Boyd, G.S. and Trzeciak, W.H. (1973)
Ann. N. Y. Acad. Sci. 212, 316-370
- [83] Boyd, G.S. and Gorban, A.M.S. (1980)
In: Molecular Aspects of Cell Regulation (Cohen, P., ed.),
Vol. 1, 95-134, Elsevier/North Holland, Amsterdam
- [84] Davis, W.W. and Garren, L.D. (1966)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 24, 805-810

- [85] Matsayuma, H., Ruhmann-Wennhold, A. and Nelson, D.H. (1971)
Endocrinology 88, 692-695
- [86] Trzeciak, W.H., Sonnenborn, U., Balkow, C. and Kunau, W.-H.
(1984)
Mol. Cell. Endocrinology 35, 131-141
- [87] Shima, S., Mitsunaga, M. and Nakao, T. (1972)
Endocrinology 90, 808-814
- [88] Behrmann, H.R. and Greep, R.O. (1972)
Horm. Metab. Res. 4, 206-209
- [89] Vahouny, R.V., Chanderbhan, R., Hinds, R., Hodges, V.A.
and Treadwell, C.R. (1978)
J. Lipid Res. 19, 570-577
- [90] Hodges, V.A., Treadwell, C.T. and Vahouny, G.V. (1978)
J. Steroid Biochem. 9, 1111-1118
- [91] Pittman, R.C. and Steinberg, D. (1977)
Biochim. Biophys. Acta 487, 431-444
- [92] Naghishineh, S., Treadwell, C.R., Gallo, L.L. and
Vahouny, G.V. (1974)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 61, 1076-1082
- [93] Wallat, S. and Kunau, W.-H. (1976)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 949-960
- [94] Trzeciak, W.H. and Boyd, G.S. (1974)
Eur. J. Biochem. 46, 201-207
- [95] Beckett, G.J. and Boyd, G.S. (1977)
Eur. J. Biochem. 72, 323-333
- [96] Naghishineh, S., Treadwell, C.R., Gallo, L.L. and
Vahouny, G.V. (1978)
J. Lipid Res. 19, 561-569
- [97] Khoo, J.C., Sperry, P.J., Gill, G.N. and Steinberg, D. (1977)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4843-4847
- [98] Sonnenborn, U., Eiteljörge, G., Trzeciak, W.H. and
Kunau, W.-H. (1982)
FEBS Lett. 145, 271-276

- [99] Cook, K.G., Lee, F.-T. and Yeaman, S.J. (1981)
FEBS Lett. 132, 10-14
- [100] Eiteljörge, G. and Kunau, W.-H. (1981)
Biochem. Soc. Trans. 9, 238 P
- [101] Cook, K.G., Yeaman, S.J., Stralfors, P., Fredrikson, G.
and Belfrage, P. (1982)
Eur. J. Biochem. 125, 245-249
- [102] Cohen, P., Yellowlees, D., Aitken, A., Donella-Deana, A.,
Hemming, B.A. and Parker, P.J. (1982)
Eur. J. Biochem. 124, 21-35
- [103] Nilsson, N.Ö., Stralfors, P., Fredrikson, G. and
Belfrage, P. (1980)
FEBS Lett. 111, 125-130
- [104] Pedersen, R.C. and Brownie, A.C. (1979)
J. Steroid Biochem. 11, 1393-1400
- [105] Ling, N., Ying, S., Minick, S. and Guillemi, R. (1979)
Life Sciences 25, 1773-1780
- [106] Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959)
Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911-917
- [107] Rouser, G., Kritchevsky, G. and Yamamoto, A. (1967)
In: Lipid Chromatographic Analysis (Marinetti, Guido, ed.),
Vol. 1, 99-162, Dekker Inc., New York
- [108] Takai, Y., Kishimoto, A., Iwasa, Y., Kawahara, Y.,
Mori, T. and Nishizuka, Y. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 3692-3695
- [109] Trzeciak, W.H. and Mathé, D. (1981)
FEBS Lett. 130, 113-118
- [110] Yasumura, Y., Buonassisi, V. and Sato, G. (1966)
Cancer Res. 26, 529-534
- [111] Schimmer, B.P. (1979)
Methods Enzymol. 58, 570-574
- [112] Walseth, T.F. and Johnson, R.A. (1979)
Biochim. Biophys. Acta 562, 11-31

- [113] Patel, K.M., Sklar, L.A., Currie, R., Pownall, H.J.,
Morissett, J.D. and Parrow, J.T.S. (1979)
Lipids 4, 816-818
- [114] Patel, K.M. and Sparrow, J.T. (1979)
Synthetic Commun. 9(4), 251-253
- [115] Khoo, J.C., Steinberg, D., Huang, J.J. and Yagelos, P.R.
(1976)
J. Biol. Chem. 251, 2882-2890
- [116] Mans, R.J. and Novelli, G.D. (1961)
Arch. Biochem. Biophys. 94, 48-53
- [117] Silber, R.H. (1966)
Methods Biochem. Anal. 14, 63-78
- [118] Chung, B.H., Wilkinson, T., Geer, J.C. and Segrest, J.P.
(1980)
J. Lipid Res. 21, 284-291
- [119] Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1974)
J. Biol. Chem. 249, 5153-5162
- [120] Weinstein, B. (1979)
Circulation 59, II-54 (Abstr. 204)
- [121] v.Harken, D.R., Dixon, C.W. and Heimberg, M. (1969)
J. Biol. Chem. 244, 2278-2285
- [122] Freeman, D.A. and Ascoli, M. (1982)
J. Biol. Chem. 257, 14231-14238
- [123] Cross, R.L. and Nalin, C.M. (1982)
J. Biol. Chem. 257, 2874-2881
- [124] Bradford, M.M. (1976)
Analyt. Biochem. 72, 248-254
- [125] Markwell, M.A.K., Haas, S.M., Bieber, L.L. and
Tolbert, N.E. (1978)
Anal. Biochem. 67, 206-210
- [126] Laemmli, U.K. and Favre, M. (1973)
J. Mol. Biol. 80, 575-599

- [127] Sweat, M.L. (1954)
Analyt. Chem. 26, 773-776
- [128] Sayers, G., Beall, R.J. and Seelig, S. (1972)
Science 175, 1131-1133
- [129] Sayers, G., Portanova, R. (1975)
Handbook of Physiol. (Greep, R.O., Astwood, E.B., eds.),
Sec. 7, Vol. 6, 41-53, American Physiological Society,
Washington
- [130] Mori, T., Takai, Y., Minakuchi, R., Yu, B. and
Nishizuka, Y. (1980)
J. Biol. Chem. 255, 8378-8380
- [131] Weiss, B. and Levin, R.M. (1982)
Adv. Cyclic Nucleotide Res. 9, 285-304
- [132] Gratecos, D. and Fischer, E.H. (1974)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 58, 960-967
- [133] Walsh, D.A. (1971)
J. Biol. Chem. 246, 1977-1986
- [134] Severson, D.L., Khoo, J.C. and Steinberg, D. (1977)
J. Biol. Chem. 252, 1484-1489
- [135] Khoo, J.C. and Steinberg, D. (1974)
J. Lipid Res. 15, 602-610
- [136] Kowal, J. (1970)
Rec. Prog. Horm. Res. 26, 623-638
- [137] Kowal, J. and Fiedler, R. (1968)
Arch. Biochem. Biophys. 128, 406-421
- [138] Faust, J.R., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1977)
J. Biol. Chem. 252, 4861-4871
- [139] Hall, P.F., Osawa, S. and Thomasson, C.L. (1981)
J. Cell Biol. 90, 402-407
- [140] Hemler, M.E., Crawford, C.G. and Lands, W.E.M. (1978)
Biochemistry 17, 1772-1779
- [141] Sun, F.F., McGuire, J.C., Morton, D.R., Pike, J.E.,
Sprecher, H. and Kunau, W.-H. (1981)
Prostaglandins 21, 333-343

- [142] Darfler, F.J., Mullen, M.D. and Insel, P.A. (1984)
Biochim. Biophys. Acta 803, 203-209
- [143] Nishizuka, Y. (1984)
Trends Biochem. Sci. 9, 163-166
- [144] Schulster, D. and Jenner, D. (1975)
J. Steroid Biochem. 6, 389-394
- [145] Hecker, E. (1978)
in Carcinogenesis (Slaga, T.J., Sivak, A. and Bontwell, R.K., eds.), Vol. 2, 11-48, Raven Press, New York
- [146] Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1982)
J. Biol. Chem. 257, 7847-7851
- [147] Tamura, S., Fujita-Yamaguchi, Y. and Larner, J. (1983)
J. Biol. Chem. 258, 14749-14752
- [148] Joseph, T., Slack, C. and Gould, R.P. (1973)
J. Embryol. Exp. Morphol. 29, 681-696
- [149] Morera, A.-M., Cathiard, A.-M. and Saez, J.M. (1978)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 83, 1553-1560
- [150] Rani, S.S., Keri, G. and Ramachandran, J. (1983)
Endocrinology 112, 315-320
- [151] Kramer, R.E., Simpson, E.R. and Waterman, M.R. (1983)
Steroids 41, 207-223
- [152] Keller-Wood, M.E. and Dallman, M.F. (1984)
Endocrine Reviews 5, 1-24
- [153] Cersia, R.V. and Malamed, S. (1983)
Biochim. Biophys. Acta 763, 83-89
- [154] Carsia, R.V., MacDonald, G.J. and Malamed, S. (1981)
Endocrinology (Suppl.) 180, 127a
- [155] Levey, G.S. and Lehotay, D.C. (1976)
In: The Enzyme of Biological Membranes (Martasoni, ed.), Vol. 4, 199-222
- [156] Glossman, H. and Gips, H. (1976)
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 292, 199-203

- [157] Hadjian, A.J., Ventre, R. and Chambaz, E.M. (1981)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 98, 892-900
- [158] Hadjian, A.J., Guidicelli, C. and Chambaz, E.M.
personal communication
- [159] Hiep, M. (1983)
Dissertation, Ruhr-Universität Bochum
- [160] Zawulich, W., Brown, C. and Rasmussen, H. (1983)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 117, 448-455
- [161] Kojima, I., Lippes, H., Kojima, K. and Rasmussen, H. (1983)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 116, 555-562
- [162] Vilgrain, I., Cochet, C. and Chambaz, E.M. (1984)
J. Biol. Chem. 259, 3403-3406
- [163] Kuo, J.F., Anderson, R.G.G., Wise, B.C., Mackerlova, L.,
Salomonsson, I., Brackett, N.L., Katoh, N., Shojii, M.
and Wrenn, R.W. (1980)
Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 7039-7043
- [164] Berridge, M.J. (1984)
Biochem. J. 220, 345-360
- [165] Bloom, F.E. (1981)
Scientific American 245, 114-124
- [166] Farese, R.V. (1984)
Mol. Cell. Endocrinology 35, 1-14
- [167] Rittenhouse-Simmons, S. (1980)
J. Biol. Chem. 255, 2259-2262

Für das Zustandekommen der vorliegenden Arbeit bin ich zu besonderem Dank verpflichtet:

Herrn Prof. Dr. W.-H. Kunau für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und seine ständige Diskussionsbereitschaft,

Herrn Prof. Dr. W. Hengstenberg für die Übernahme des Korreferates,

Herrn Prof. Dr. K. Meller und Herrn Dr. R. Veh für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen,

Herrn Dr. A. Maelicke, Max-Planck Institut Dortmund, für die Überlassung der Y-1 Zellen,

Herrn Dr. M. Hiep für die Präparation der katalytischen Unter-einheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase aus der Rinderneben-niere,

Herrn Dr. U. Sonnenborn für die Herstellung von Proteinkinase-Inhibitor aus Kaninchenmuskel,

Herrn R. Thieringer für die Präparation von Phosphatidylserin,

Herrn Prof. Dr. H. Werchau, Herrn Dr. F. Mehnert und allen Mitarbeitern des Lehrstuhls Medizinische Mikrobiologie-Virologie für die Bereitstellung eines sterilen Arbeitsplatzes sowie für die freundliche Unterstützung beim Umgang mit Zellkulturen,

allen Mitarbeitern des Instituts für Physiologische Chemie, Lehrstühle I und II, vor allem den Mitgliedern der Arbeitsgruppe für Bioorganische Chemie für die freundliche Unterstützung und hilfreichen Diskussionen.

LEBENS LAUF

Cornelia Balkow

23.08.1957

Geboren als Tochter der Eheleute
Heinz und Hannelore Balkow, geb.
Kittlaus, in Mülheim-Ruhr

1964 - 1968

Besuch von Volksschulen in Mülheim-
Ruhr und Bochum

1968 - 1976

Besuch des Theodor-Körner-Gymnasiums
in Bochum

Juni 1976

Abitur

Okt. 1976

Aufnahme des Studiums der Biologie an
der Ruhr-Universität Bochum

Okt. 1978

Ablegung der Diplom-Vorprüfung

Aug. 1980

Ablegung des mündlichen Teils der
Diplom-Hauptprüfung

Sept. 1980 - Juni 1981

Anfertigung der Diplomarbeit am Lehr-
stuhl Biochemie der Pflanzen der Ruhr-
Universität Bochum mit dem Titel:
"Untersuchungen zur Wirkungsweise von
Inhibitoren der L-Aspartat- α -Keto-
glutarat-Transaminase"

Sept. 1981 - Sept. 1984

Anfertigung der vorliegenden Doktor-
arbeit am Lehrstuhl für Physiologische
Chemie I, Arbeitsgruppe für Bioorgani-
sche Chemie, der Ruhr-Universität Bochum

